JULIANA BRANDSTETTER VILAR

**MECANISMOS DE REPARO DE DNA ENVOLVIDOS COM LESÕES INDUZIDAS
POR AGENTE ALQUILANTE (NIMUSTINA) EM CÉLULAS HUMANAS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA DE GLIOMAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

JULIANA BRANDSTETTER VILAR

**MECANISMOS DE REPARO DE DNA ENVOLVIDOS COM LESÕES INDUZIDAS
POR AGENTE ALQUILANTE (NIMUSTINA) EM CÉLULAS HUMANAS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA DE GLIOMAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vilar, Juliana Brandstetter.

Mecanismo de Reparo de DNA envolvidos com lesões induzidas por agente alquilante (Nimustina) em células humanas e sua associação com a resistência de gliomas / Juliana Brandstetter Vilar. — São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Reparo de DNA.

Versão do título para o inglês: Mechanisms of DNA Repair involved with lesions induced by alkylating agent (Nimustine) and its association with gliomas chemoresistance.

1. Resposta aos danos no DNA 2. Nimustina (ACNU) 3. NER 4. TLS 5. ICLs 6. Gliomas I. Menck, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0151/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliana Brandstetter Vilar.

Título da Tese: Mecanismos de Reparo de DNA envolvidos com lesões induzidas por agente alquilante (Nimustina) em células humanas e sua associação com a resistência de gliomas.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7430
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 29 de outubro de 2008.

PARECER 864/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da ICB*, em sua 89ª reunião realizada em 24.10.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação da ação genotóxica induzida por ACNU em células humanas, pelo silenciamento de genes de reparo de DNA por RNA Interferência*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, com a recomendação de que seja apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto anterior, e que o cadastro da teca será readequado as informações serão enviada oportunamente.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25 de outubro de 2009**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
JULIANA BRADSTETER VILAR
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira" Av. Prof. Linus Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone: (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NA EM PESQUISA</p>
---	---

Decl. CEP SH. 027/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao **PARECER 864/CEP**, de 29.10.2008, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Mecanismos de reparos de DNA induzidos por agente alquilante (Nimustina) em células humanas e a sua associação com a resistência de gliomas*" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 01 de setembro de 2014.

Prof. Paolo Zanotto, D. Phil.
LEMB-ICB-USP

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEP SH- ICB /USP

Esta tese é o resultado de muitos experimentos e de incontáveis experiências. Ao final de cada linha, poder-se-ia desenrolar um novelo. Desenrolo-o. Desfio-o pelo avesso, como quem mostra o reflexo do espelho. Antes de ser uma tese, esta era um projeto e, antes de sê-lo, era um sonho. Sonhado de forma modesta e imprecisa por sua autora, pela autora da autora, e pela autora desta:

No centro do mundo, interior de Goiás, uma mulher chamada Maria, costureira, analfabeta, talvez por não reconhecer qualquer letra dava valor à palavra; e esta lição ensinou aos seus filhos e netos. Maria, minha saudosa avó, gerou à Diná, minha amada mãe, que gerou a mim. Sou a filha única desta coleção de histórias, embora haja outras.

Meu passado está repleto da presença de minha mãe. O meu caráter, lapidado por seus bons exemplos; Minhas conquistas, alicerçadas por sua força. Eu não saberia definir o instante exato em que passamos a compartilhar o mesmo sonho. Nem tampouco apontar quando não houve de sua parte o mesmo esforço. Testemunha da minha vida, eu bem sei que nada poderia privá-la deste momento de celebração... Meu coração se derrama como a champagne que não se aguenta contida em si mesma! Ele a procura para o nosso brinde, esta é a hora da cumplicidade do nosso abraço, de nos olharmos aliviadas e vermos através dos olhos que, enfim, alcançamos o que buscávamos...

Ela, porém, não está mais aqui.

Insensata morte... Que separa os filhos dos pais na hora da paga por seu trabalho.

E se já não mais nos veremos... E estaremos infinitamente distantes neste ponto da existência - onde poderia eu, gaivota em vôo raso, depositar as rosas multicores de gratidão que desabrocharam em meu peito? Uma parte está escrita aqui: Sua memória será reconhecida pelas boas coisas que me fez, embora não as tenha feito apenas a mim... E saberão todos que tudo o que alcancei foi porque a tive comigo desde o princípio da minha jornada. Este é o princípio da justiça. E a parte que sobrar, o amor que ultrapassa o limite das palavras, peço ao Senhor, Deus meu, que colha todas essas flores; que recolha todas as minhas lágrimas; e as torne um agradável perfume para o seu descanso.

AGRADECIMENTOS

Ufa! Parecia que não ia acabar nunca. Mas acaba. Os ciclos se fecham e no mesmo instante que se coloca o ponto final sente-se na sua pausa a saudade. E a nostalgia. Como é difícil olhar para trás, para esses anos de trabalho, sem marear os olhos!

Me lembro quando entrei no mundo da ciência e acompanhava nas palestras, anônima, ao Prof. Dr. Menck. Eu o observei por anos: da minha iniciação científica aos meus anos como professora substituta na UFG (substituta, gente!). E sempre fomentei a esperança de vir para São Paulo tê-lo como meu orientador. Eu vim quase como uma retirante, com mais coragem do que planos, na bagagem. Quanta ousadia sair de um instituto onde tudo e todos me eram conhecidos, onde eu houvera formado praticamente uma segunda família e migrar para o incerto na Paulicéia Desvairada. E então fui aceita em seu laboratório. Que desafio e responsabilidade! E por isso, e por muito mais, tenho tanto a agradecer ao meu querido Prof.! Por ter aceitado me orientar no meu doutorado; pela paciência em ensinar, pelo respeito ao meu próprio tempo e condição humana, por ter me incentivado e, assim, proporcionado a melhor experiência da minha vida e do meu filho, que foi nossa ida para Alemanha; por sua maneira de acreditar em seus alunos, nos fazendo crescer, e por sua capacidade de nos surpreender positivamente sempre! Um professor e pesquisador exemplar! Que bom poder participar da história de um cientista tão brilhante e de um ser humano tão afável. É um privilégio! Obrigada, Prof.!

Ainda, outros professores também forjaram em mim o pensamento científico, me inspiraram a seguir a carreira científica e me incentivaram a alçar vôos para além de onde eu lia nas paredes “Ama esta casa como se fora outra casa de teus pais”: minha orientadora de IC e do mestrado, Dra. Lee Chen Chen. Dr. Alexandre (o Coelho), Dra Ludmila, Dr. Lázaro (o Batata), Dr. Athur (o Rei), Dr. João Batista e (meu tio) Dr. Edward (Madureira), que até reitor virou! Todos professores excepcionais da UFG. Quantas saudades sinto das tiradas estatísticas, que me induziram estudar biometria sem sentir dor (ou quase!). Havia um preço alto a se pagar para poder entender e rir da piada! Saudades das nossas rodas de viola, nossas festas de fim de ano e amigos- secretos sem marmelada, nossas cantorias nos ônibus para as conferências e, enfim, a viola na praça, que de noite tomava o lugar da tenda da genética, nos congressos da vida. É um privilégio tê-los como professores e amigos!

I might also thank very much Dr. Bernd Kaina, who received me in Germany as a guest scientist at the Institute of Toxicology of the University of Medicine of Mainz and gave me support to finish my Phd thesis. This was such unbelievable great enriching scientific and personal experience in my life. Thank you very much for your kindness in receiving me and my son, for your supervision and support! I would like to thank also Dr. Theodora Nikolova, for her

hospitality in relation to us, collaboration in the lab work and the opportunity to contribute as a co-author for the review paper in nitrosoureas we have written. I am also grateful for the kind technician Anna, who helped me with the comet assays.

I should also give a very special thank to Dr. Marcus Eich, who took really care of me while I was in Germany and since: my colleague who became a friend, then my official german-english translator, my rides to work through the seasons as I have never experienced before: such flowering spring, vivid summer, coloured autumn and the white winter. Then my best friend, my collaborator, support, advisor, my effective help in difficult times, my therapist from Sunday to Friday. My allarm. You did so much for me! You have such a big heart! Nothing I can say would be enough to express my gratitude and joy for our friendship! Thank you for not let me give up. And specially, thank you for not giving up of me! I was so lucky to meet you!

Ainda: ao atual Prof. da Universidade de Washington, Dr. Luiz F. Z. Batista, que me supervisionou no lab assim que comecei, me ensinou os meus primeiros passos em cultura de células, me ajudou a pensar o meu projeto de doutorado e teve comigo as conversas que eu precisava e que me prepararam para encarar o lado negro da força. Lu, seu brilhantismo, humildade e simpatia foram grandes exemplos para mim. A prova de que pessoas realmente inteligentes e competentes não precisam pisar em ninguém para seguir e ser reconhecido. Obrigada!

À minha querida amiga e colega Clarissa, que colaborou comigo em diversos experimentos que talvez eu levasse uma vida até adquirir a experiência necessária para fazê-los bem feitos sozinha. Claris, você é outro grande exemplo para mim. Sua competência é surpreendente e sua alma iluminada! Obrigada pelas tardes de trabalho tão produtivas quanto divertidas. Obrigada pelas conversas, pelo incentivo e por seu caráter, que mesmo em meio aos vendavais, nunca mudou com o vento.

Então, preciso agradecer de forma muito especial também às minhas colegas e amigas do lab: Lígia, Alessandra e Letícia. Não é eufemismo dizer que vocês possivelmente salvaram a minha vida, quando no pico da minha doença me levaram para suas casas e cuidaram de mim. Que entenderam minhas limitações e sem julgamentos só me ajudaram. Foram minhas terapeutas, minhas fiéis escudeiras, incentivadoras do meu trabalho. E à Lí, que no fim desta tese, ficou ao meu lado, revisando-a comigo, para que o fim chegasse mais rápido. Do fundo do meu coração: obrigada, babies!

Agradeço profundamente à Eliza, que era secretária do nosso lab. Mas que tornou-se minha grande amiga, que me adotou e se tornou minha mãe paulistana. Eliza, obrigada por seu

trabalho, que tornava a nossa vida tão mais fácil. Obrigada pelas orações, pelos abraços, pelas conversas, por todo apoio, por estar sempre ao meu lado. Você faz muita falta no lab e na minha rotina! E à Maria Helena, cujo trabalho e alegria tornam nosso trabalho menor e mais feliz!

Obrigada, também, à todos os colegas do lab, pois apenas com uma equipe assim tão competente criamos um ambiente tão rico e colaborativo, que possibilitou as trocas necessárias para o nosso desenvolvimento coletivo. E muita gente passou pelo lab, deixando cada um sua própria contribuição! Tati, Kero, Lu A, Lu V, Stephano, Helots, Melissa, Ric, Regina, Raquel, Carol Berra, Carol Strano, Dani, Marioli, Maribel, Angel, Bárbara, Luíza, Luíz, Apuã, Andrezão, Teiti, Marinas, Rosa, Janu, Vânia, Rodrigo G, Rodrigo F, Huma, Lívia, Nat, Nil, Lu G, Camila, Alê V, Annabel, Davi, Edu, Vítor, Leo, Satoru, Francisco, Veri e Do Carmo. E nos labs vizinhos, especialmente Cariri, Rafael e Luis.

I should also thank my colleagues and friends from the Institute of Toxicology in Mainz. I swear I could never imagine Germans could be SO NICE! Thank you Dr. Wynand, Dr. Markus, Dr. Christina, Dr. Chirstina, Dr. Dagmar, Dr. Dietrich, Dr. Dorthé, Dr. Maya, Dr. Ana, Dr. Steve, Dr. Jörg, Dr. Adam, Dr. Matina, Dr. Karl (with a Hug!), Birgit, Georg, Giuseppina, Wanessa, Daniel, Nicole, Thomas, Olivier, Nancy, Steffie, Bastian, Bekky, Andrea and Anja. I really loved the time I was with you and you all contributed to make it unforgettable. Additionally, I could learn so much from each of you! And my acknowledgments to Huong and Pieter, who helped me find an amazing school to Pedro! E aos amigos brasileiros, colegas de profissão espalhados pela Alemanha, minha querida ‘gangue’ em terras estrangeiras, que me ajudaram na adaptação, me deram força e muito ânimo: Sâmeque, Evandro, Fernanda, Ana Dantas e o síndico, Vítor. Obrigada!

Outro agradecimento muito importante é à Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas e todos os seus funcionários, dentre esses, especialmente à Gisele. E essencialmente devo agradecer à *FAPESP*, pela bolsa que me foi concedida e todo financiamento da pesquisa, e à *CAPES*, pela bolsa de doutorado sanduíche. Sem essas instituições e a contribuição do povo brasileiro, que com seus impostos financiam a pesquisa no país, este doutorado não seria possível. Obrigada!

Ainda que de fora da Academia, uma galera esteve comigo e me ajudou a concluir esta etapa: Vander, a quem posso recorrer a qualquer tempo, para qualquer parada. Amigo, companheiro, acessor para assuntos de informática. Meu suporte e conselheiro. Andrea, minha amiga-irmã que a vida me deu com uma família maravilhosa junto. Isaac, meu mais novo amigo de infância. Marcelo, meu amigo querido sempre preocupado e à postos, e sua família tão linda! Nicole, minha amiga do coração e sua boa vontade em me ajudar em tudo. Elaine, minha amiga

querida e incentivadora. Pabline, Letícia, Vivi. A galera do cume (Olimpus), Betinho, Marco, Arthur, Aline, Michele e Catota (além do Satoru e do Vítor), cujas portas estiveram sempre abertas para mim, com pizzas, filmes, pipoca e poker. Todos vocês foram muito importantes e contribuíram muito para minha vida e sanidade mental! Obrigada!

De coração, agradeço a todos da minha família Brandstetter, que me ajudaram em todos os momentos nos cuidados com a minha mãe. Todos os meus tios e tias, primos e primas, que apesar da distância e do tempo que não nos vemos, não afetou em mim o amor que tenho por todos. Só fez as saudades aumentadas! Também à minha família Vilar, especialmente meu pai e Ma. Antônia, pela ajuda na administração das minhas coisas em Goiânia e no cuidado do Pedro Paulo, por ocasião do seu retorno da Alemanha. Sem vocês, tudo seria mais difícil! Obrigada!

Enfim, agradeço ao meu filho, Pedro Paulo, que é e sempre foi a minha razão para lutar e força para viver. Obrigada por ter crescido e por todo orgulho que me proporciona! Meu amor por você é eterno e imensurável.

À minha mãe, Diná Gaston Brandstetter (*in memoriam*), por tudo, tudo, que me deu e ensinou.

E à Deus, que apesar da minha pouca fé, ainda me protege de modo incontestável.

Beijos, Valeu!

Ao vencedor, as batatas!

Machado de Assis (em Quincas Borba)

RESUMO

VILAR, J. B. **Mecanismos de reparo de DNA envolvidos com lesões induzidas por agente alquilante (Nimustina) em células humanas e sua associação com a resistência de gliomas.** 2014. 185 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A quimiorresistência de tumores constitui um dos maiores obstáculos que levam comumente ao fracasso da terapia. Os mecanismos relevantes que contribuem para a resistência celular incluem: bombas de efluxo; alterações na interação entre a droga e o seu alvo e mudanças nas respostas celulares, em particular uma habilidade aumentada de reparar os danos induzidos no DNA e defeitos nas vias apoptóticas. A capacidade de reparar os danos no DNA e a evasão da apoptose são de grande importância, uma vez que a maioria dos quimioterápicos tem sua ação baseada na indução de citotoxicidade pela capacidade de gerar lesões no DNA. Desta forma, uma importante estratégia para melhorar a quimioterapia é o desenvolvimento de abordagens mais seletivas e mecanismos que contornem a resistência tumoral. Neste trabalho, através de um estudo sobre os genes e suas respectivas vias envolvidas no reparo, capacidade de sobrevivência e sinalização de danos induzidos pela nimustina (ACNU) - um agente cloroetilante comumente utilizado em tratamentos quimioterápicos de tumores sólidos - identificamos genes potencialmente alvos para uma terapia adjuvante. Demonstramos que células de glioma p53mt tem menor capacidade de reparo de ICLs induzidos por esta droga do que células p53wt. Também, que a via de NHEJ (*“Non Homologous End Joining”*) não é uma via preferencial de reparo dessas lesões, mas que a via de NER (*“Nucleotide Excision Repair”*) (ou especificamente os produtos gênicos XPA, XPC e XPF) é bastante importante. Curiosamente, na ausência de XPA, NHEJ assume uma participação no reparo dessas lesões, provavelmente devido a um aumento no número de DSBs e saturação das outras vias de reparo. Da mesma forma, verificamos que a DNA polimerase POLH (XPV), envolvida em TLS (*“Translesion Synthesis”*), também participa na tolerância dessas lesões. Neste contexto, encontramos evidências de que a polimerase TLS (especificamente POLH e POLK) apresentam-se superexpressas em amostras de gliomas, podendo desta forma concorrerem tanto para a tumorigênese quanto para a resistência observada nestes tipos tumorais. Por fim, realizamos o silenciamento gênico através da tecnologia de RNAi, que reprimem os genes pela eliminação do transcrito mRNA correspondente, prevenindo a síntese protéica. Os genes-alvo escolhidos para o silenciamento foram, desta forma, XPC, XPF, POLH e POLK. O silenciamento gênico de XPC, XPF e POLH demonstraram-se capazes de sensibilizar significativamente células de glioma, permitindo-nos sugerir estas proteínas como elementos importantes na quimioresistência de gliomas ao ACNU e colocando a inibição dessas moléculas como uma estratégia importante na sensibilização de gliomas ao ACNU e potencialmente a outros agentes quimioterápicos com o mesmo mecanismo de ação.

Palavras-chave: Respostas aos Danos no DNA. NER. TLS. ICL. ACNU. Gliomas.

ABSTRACT

VILAR, J. B. **Mechanisms of DNA repair involved with lesions induced by alkylating agent (Nimustine) in human cells and its relationship with glioma chemoresistance.** 2014. 185 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The chemoresistance of tumors is one of the most important obstacles that commonly lead to the failure of therapy. The main mechanisms that contribute to cellular resistance include efflux pumps; changes in the interaction between the drug and its target and changes in cellular responses, in particular an increased ability to repair induced DNA damages and defects in apoptotic pathways. The ability to repair DNA damage and evasion of apoptosis are of great importance, since most chemotherapy has its action based on the induction of cytotoxicity by the ability to generate DNA lesions. Thus, an important strategy for improving chemotherapy is the development of more selective mechanisms that circumvent tumor resistance approaches. In this work, through a study of genes and pathways involved in the repair, survival and damage signaling induced by nimustine (ACNU) - a cloroethylating agent commonly used in treatments of solid tumors - we aimed to identify target genes for a potentially adjuvant therapy. We demonstrated that glioma cells p53mt have less ability to repair ICLs induced by this drug than p53wt cells. Also, that the NHEJ ("*Non Homologous End Joining*") pathway is not the main route of repair of these lesions, but that the NER ("*Nucleotide Excision Repair*") pathway (or specifically the gene products XPA, XPC and XPF) is very important. Interestingly, in the absence of XPA, NHEJ takes place in the repair of those lesions, probably due to an increase in the number of DSBs and saturation of other repair pathways. Likewise, we found that DNA polymerase involved in TLS ("*Translesion Synthesis*") POLH (XPV) also participates in tolerance of such lesions. We also found evidence that TLS polymerases (specifically POLH and POLK) are overexpressed in gliomas samples and could play a role in the tumorigenesis and in the resistance observed in these tumor types. Finally, we performed gene silencing through RNAi technology, which repress genes by eliminating the corresponding mRNA transcript, preventing protein synthesis. The target genes selected for silencing were XPC, XPF, POLH and POLK. The knockdown of XPC, XPF and POLH proved to significantly sensitize glioma cells, suggesting these proteins as important elements in the chemoresistance of gliomas and highlighting the inhibition of these molecules as an important strategy in the sensitization of gliomas to ACNU and probably to other chemotherapeutic agents with the same mechanisms of action.

Keywords: Dna damage responses. NER. TLS. ICL. ACNU. Gliomas.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1. Vias de sinalização na presença de danos no DNA.....	34
Figura 2. Esquema ilustrativo da via de GGR- NER	38
Figura 3. Esquema ilustrativo da via de HRR	42
Figura 4. Esquema representativo da via de NHEJ	45
Figura 5. Esquema representativo da via de FA	48
Figura 6. Modelos Representativos dos possíveis mecanismos de TLS	55
Figura 7. Modelos de transformação maligna, em GBMs	62
Figura 8. Esquema ilustrativo do desenvolvimento diferencial de GBMs Primários e Secundários	68
Figura 9. Esquema ilustrativo das principais lesões induzidas por ACNU e TMZ	74
Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho. Nome de cada linhagem celular, sexo do doador das células, principais alterações genótípicas, fenótipo, origem tecidual e as principais referências em relação a elas.....	76
Figura 10. Representação da construção dos vetores utilizados nos ensaios de HCR	83
Figura 11. Viabilidade celular de gliomas ao quimioterápico ACNU	91
Figura 12. Indução de apoptose em gliomas tratadas com quimioterápico ACNU	93
Figura 13. Efeito citotóxico do tratamento com ACNU em diferentes linhagens mutadas em NER ou TLS	95
Figura 14. Viabilidade celular em mutantes de NER e TLS após tratadas com ACNU e inibidor de NHEJ	97
Figura 15. Cinética do ciclo celular de fibroblastos humanos frente ao tratamento com ACNU ou ACNU e Ly294002	100
Figura 16. Cinética do conteúdo de Sub-G1 de células mutantes em NER e TLS frente ao tratamento com ACNU ou ACNU e Ly294002.....	102
Figura 17. Cinética de indução de γ H ₂ AX frente ao tratamento com ACNU ou ACNU e Ly294002	104
Figura 18. Medida da atividade de reparo (HCR) após o tratamento com diferentes doses de ACNU	106
Figura 19. Teste do cometa adaptado para detecção de ICLs em gliomas	108
Figura 20. Teste do cometa adaptado para detecção de ICLs em fibroblastos humanos.....	109
Figura 21. Efeito do silenciamento gênico de NER em glioma a sensibilidade ao ACNU.....	111

Figura 22. Expressão protéica de enzimas TLS em tecidos de cérebro normal e tecidos de GBM, por WB	112
Figura 23. Indução de resposta aos danos no DNA em células U87MG (p53wt) silenciadas para TLS, por imunofluorescência	114
Figura 24. Efeito do silenciamento gênico de TLS Pols em células de glioma tratadas com ACNU	116
Figura 25. Indução de apoptose pelo tratamento com TMZ em diferentes linhagens mutadas em NER ou TLS.....	117
Figura 26. Modelo indicando o reparo de monoadutos induzidos por ACNU pela via de NER	138
Figura 27. Modelo indicando o reparo de ICLs induzidos por ACNU pela via de NER e TLS	139
Figura 28. Esquema representativo da via de reparo de ICLs durante a replicação	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4PP- em português “6-4 fotoprodutos”

AA- Agentes Alquilantes

AAF- Acetilaminofluoreno

ACNU- Nimustina: “3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride”.

AIC- 5-aminoimidazole-4-carboxamide

AIDS- em português, “Síndrome da Imunodeficiência Adquirida”

AKT- em português, “Proteína Quinase B”

ANOVA- em português, “Análise de Variância”

AP- Apurínico/Apirimidínico

APC/C- em português, “Complexo Promotor de Anáfase ou Ciclossomo”

AT- Ataxia Telangiectasia

ATM- em português, “Mutado em Ataxia Telangiectasia”

ATP- Adenosina Trifosfato

ATR- em português, “Relativo à Ataxia Telangiectasia”

BaP- Benzo[a]pireno

BBB- em português, “Barreira Hemato-Encefálica”

BCNU- Carmustina: 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea

BER- em português, “Reparo por Excisão de Bases”

BH- em português, “motivos com homologia a BCL-2”

BRCA- em português, “Cancer de Mama”

CCNU- Lomustina: (3-(2-chloroethyl)-1-cyclohexyl-3-nitrosourea)

CDC- genes de Controle da Divisão Celular

CDK- em português, “Ciclina Dependentes de Quinases”

CED- em português, “Entrega de Droga Reforçada”

CENUs- Nitrosouréias

CKI- em português, “Inibidor de Ciclina Quinase”

CPD- em português, “Ciclobutano de Pirimidinas”

CRC- em português, “Câncer Colorretal”

CS- em português, “Síndrome de Cokeyne”

CSC- em português, “Célula Tronco Tumoral”

DBD- em português, “Domínio de Ligação ao DNA”

DD- em português, “Domínio de Morte”

DDR- em português, “Respostas ao Dano no DNA”

DEB- Diepoxibutano

DISC- em português, “Complexo de Sinalização de Indução de Morte”

DNA- em português, “Ácido Desoxirribonucleico”

DNA-PK- em português, “Proteína Quinase Dependente de DNA”

DNA-PKcs- em português, “Proteína Quinase Dependente de DNA, subunidade catalítica”

dNTP- em português, “Desoxirribonucleotídeos Fosfatados”

DO- Densidade Óptica

DSB- em português, “Quebras duplas”

DSBR- em português, “Reparo de Quebras Duplas”

EGFR- em português, “Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico”

EORTC- em português, “Organização Européia Para Pesquisa e Tratamento do Câncer”

FA- em português, “Anemia Fanconi”

FACS- em português, “Separação de Células Ativadas por Fluorescência”

FADD- em português, “Domínio de Morte associado ao domínio FAS”

FANC- Proteínas Fanconi

FCS- em português, “Soro fetal bovino”

GBM- Glioblastoma Multiforme

GFAP- em português, “Proteína Ácida do Filamento da Glia”

GGR- em português, “Reparo Geral do Genoma”

GSC- em português, “Célula Tronco da Glia”

HAT- em português, “Histonas Acetiltransferases”

HCR- em português, “Reativação do Gene Repórter”

HNPCC- em português, “Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipóide”

HR- em português, “Recombinação Homóloga”

ICL- em português, “Ligação Cruzada entre Fitas”

IDH- em português, “Isocitrato Dehidrogenase”

IDLs- em português, “Alças de Inserção/Deleção”

IF- Imunofluorescência

IGFR- em português, “Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina”

IM- em português, “Membrana Interna (da mitocôndria)”

IMS- em português, “Espaço intermembranas (da mitocôndria)”

LOH- em português, “Perda de Heterozigosidade”

MDM- em português, “cromossomo Murino de Duplo Minuto”

MDR- em português, “Resistência a Múltiplas Drogas”

MGMT- Metil-guanina-metil-transferase

MLH- em português, “Homólogo Humano de MutL”

MMR- em português, “Reparo de Maus Pareamentos”

MPF- em português, “Fator Promotor da Mitose”

MPP- em português, “Poro de Permeabilidade Mitocondrial”

MRN- em português, “Complexo MRE11, RAD50 e NBS”

mRNA- RNA mensageiro

MSH- em português, “Homólogo Humano de MutS”

MSI- em português, “Instabilidade por Microsatélites”

MT- Mutado

MTIC- *5-(3-Metiltriazeno-1-yl)imidazole-4-carboxamide*

mTOR- em português, “Alvo da Rapamycina”

NADPH- em português, “Nicotinamida Adenina Dinucleotide Fosfato”

NBS- em português, “Síndrome de Nijmegen”

NCIC- em português, “Instuto Nacional de Câncer do Canadá”

NER- em português, “Reparo por Excisão de Nucleotídeos”

NES- em português, “Sinal de Exportação Nuclear”

NHEJ- em português, “União Terminal Não-Homóloga”

NLS- em português, “Sinal de Localização Nuclear”

NSC- em português, “Célula Tronco Neural”

NT- Nucleotídeo

OM- em português, “Membrana Externa (da mitocôndria)”

PARP- em português, “Poli(ADP-ribose)polimerase”

PCNA- em português “Antígeno Nuclear de Proliferação Celular”

PDGF- em português, “Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas”

PDGFR- em português, “Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas”

PDK- em português, “Piruvato Dehidrogenase Quinase”

PI- em português, “Iodeto de Propídio”

PI3K- em português, “Fosfoinositol 3-Quinase”

PID- em português, “Imunodeficiências Primárias”

PIKK- em português, “Quinase relacionada a PI3K”

PIP- em português, “Fosfatidilinositol X- Fosfato”

POL- Polimerase

PS- em português, “Fosfatidilserina”

PTEN- em português, “Homólogo da phosphatase e tensina”

PTP- em português, “Poro de Transição e Permeabilidade

RB- Retinoblastoma

RE- em português, “Elementos Responsivos”

RFC- em português, “Fator de Replicação C”

RNA- em português, “Ácido Ribonucleico”

RNAi- RNA interferência

RNAP- RNA Polimerase

RO- em português, “Origem de Replicação”

ROS- em português, “Espécies reativas de Oxigênio”

RPA- em português, “Proteína de Replicação A”

RT- em português, “Transcriptase Reversa”

RTK- em português, “Receptor Tirosina Quinase”

SCGE- em português, “Eletroforese em Gel de Células Individualizadas”

siRNA- em português, “RNA de silenciamento”

SLF- em português, “Síndrome de Li-Fraumeni”

SNC- Sistema Nervoso Central

SOS- código de emergência

SSA- em português, “Anelamento de Fita Simples”

ssDNA- em português, “DNA fita simples”

SSEA- em português, “Antígeno Embrionário Estágio-específico”

TAM – em português, “Macrófagos Associados ao Tumor”

TCR- em português, “Reparo Acoplado à Transcrição”

TIC - em português, “Célula Iniciadora do Tumor”

TLS- em português, “Síntese Translesão”

TM- em português, “Momento da Cauda”

TMZ- Temozolamida: (“*3,4-dihydro-3-methyl-4-oxoimidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-8- carboxamide*”)

TNF- em português, “Fator de Necrose Tumoral”

TNF-R- em português, “Receptor do Fator de Necrose Tumoral”

TRADD- em português, “Proteína Associada ao Domínio de Morte de TNFR1”

TRAF- em português, “Receptor Associado ao Fator TNF”

TRAIL- em português, “Ligante de Indução da Apoptose Associado à TNF”

Treg- Células T regulatórias

TTD- Tricotiodistrofia

USP- em português, “Peptidase específica de Ubiquitina”

UV- Ultravioleta

WHO- em português, “Organização Mundial da Saúde”

WT- em português, “Selvagem”

XFE- síndrome progeróide de XPF-ERCC1

XP- Xeroderma Pigmentosum

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Aspectos gerais	23
1.2	Respostas aos Danos no DNA.....	25
1.2.1	<i>TP53: O guardião do genoma e suas múltiplas facetas.....</i>	26
1.2.2	<i>Checkpoints do ciclo celular: cada passo a seu tempo.....</i>	30
1.2.3	<i>Reparo de DNA: consertando erros.....</i>	36
1.2.4	<i>Tolerância aos danos no DNA: suportar também é preciso.....</i>	53
1.2.5	<i>Vias apoptóticas: o benefício do fim.....</i>	56
1.3	Glioblastoma Multiforme (GBM).....	58
1.3.1	<i>Origem e características das células tumorais.....</i>	60
1.3.2	<i>GBMs primários, secundários e vias genéticas envolvidas.....</i>	64
1.4	Estratégias Terapêuticas	69
1.4.1	Agentes alquilantes.....	71
2	OBJETIVOS	75
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3.1	Culturas celulares	76
3.2	Tratamentos	78
3.3	Silenciamento Gênico	79
3.4	Sobrevivência Celular – Recuperação Clonogênica	80
3.5	Viabilidade Celular – XTT	80
3.6	Análise do conteúdo de Sub-G1 por citometria de fluxo	80
3.7	Dupla marcação de Anexina V/PI por citometria de fluxo	81
3.8	Imunofluorescência por citometria de fluxo	81
3.9	Host cell reactivation (HCR).....	82
3.9.1	Produção dos plasmídeos de interesse para os diferentes experimentos ...	82
3.9.2	Ensaio de HCR.....	84
3.10	Teste do Cometa adaptado para detecção de ICLs.....	84

3.11	Imunofluorescência (IF) por microscopia.....	85
3.12.	Expressão protéica.....	86
3.12.1	<i>Extração protéica a partir das linhagens celulares e das amostras de tecidos</i> <i>do</i> <i>cérebro</i>	86
3.12.2	<i>Bradford</i>	87
3.12.3	<i>Imunodeteção por Western-Blot</i>	87
3.13	Análises estatísticas	88
4	RESULTADOS	89
4.1	Influência de NHEJ na viabilidade de células de gliomas tratados com ACNU	89
4.2	Influência de NHEJ na indução de apoptose de células de gliomas tratados <i>com</i> <i>ACNU</i>	92
4.3	Participação de NER e TLS na citotoxicidade induzida por ACNU	93
4.4	Influência de NHEJ na viabilidade de células XP tratadas com ACNU	95
4.5	Cinética da distribuição do ciclo celular de células XP diante do tratamento com ACNU e Ly294002	97
4.6	Cinética do conteúdo de Sub-G1 de mutantes em NER e TLS diante do tratamento com ACNU e Ly294002	101
4.7	Cinética da indução de γ H2AX em células humanas diante do tratamento com ACNU e Ly294002.....	102
4.8	Perfil diferencial da capacidade de reparo de células humanas de plasmídeos tratados com ACNU	104
4.9	Perfil diferencial da capacidade de reparo de ICLs de células de glioma p53wt <i>e</i> <i>p53mt</i>	106
4.10	Capacidade de reparo de ICLs de células MRC5 e XP-C	108
4.11	Sensibilização de células de glioma ao tratamento com ACNU pelo silenciamento gênico de NER	109

4.12	Expressão diferencial de TLS Pols em GBMs e tecidos cerebrais normais	111
4.13	Indução de resposta aos danos no DNA por ACNU em células de glioma silenciadas para TLS Pols	113
4.14	Sensibilização de células de glioma ao tratamento com ACNU pelo silenciamento gênico de TLS Pols	114
4.15	Investigação da participação de NER e TLS na citotoxicidade induzida por TMZ	116
5	DISCUSSÃO	118
6	CONCLUSÕES.....	145
7	PERSPECTIVAS	146
	REFERÊNCIAS	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Esta tese aborda um tema que acabei por conhecer de duas maneiras: a primeira, teórica e experimental, encontrei nos livros, artigos, conferências, entre professores renomados e hipóteses testadas em laboratórios. Paralelamente, também o conheci em seus bastidores - em suas esferas social, emocional e psicológica - que abrigam, conjuntamente, a mesma diversidade do seu componente genético/biológico.

Dados sugerem, no entanto, que o que eu de modo particular testemunhei dos bastidores não foi, e continua não sendo, um fato isolado: estima-se que no ano de 2008, 7,6 milhões de mortes no mundo tenham ocorrido devido ao câncer e que 12,7 milhões de novos casos sejam reportados todos os anos. É, notoriamente, a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento. Nestes, a incidência da doença tem aumentado como resultado do crescimento e envelhecimento populacional, além de uma maior adesão a estilos de vida associados ao câncer, como o tabagismo, sedentarismo e dietas ocidentalizadas (FERLAY et al., 2010).

Apesar dos grandes esforços em todo o mundo no sentido de superar este grande problema de saúde pública, a “*American Cancer Society*” estima que a incidência de câncer nos EUA diminui 0,6% por ano nos homens (porém permanece estável nas mulheres), enquanto as taxas de óbitos diminuem menos de 2% ao ano para ambos os sexos (JEMAL et al., 2008). Estas estimativas mostram que ainda resta um longo caminho no entendimento que nos levará a tratamentos mais efetivos e, por conseguinte, à cura do câncer.

A complexidade e variabilidade do câncer como doença há muito é reconhecida. Manifesta-se com diferenças dramáticas em relação ao tempo de iniciação, progressão e impacto patogênico, evidente na gama de tecidos susceptíveis ao crescimento proliferativo aberrante. Esta grande variabilidade está inequivocamente presente em múltiplos níveis: genético, cromossômico, histológico, fisiológico, patológico e em termos de prognóstico (DE PALMA; HANAHAN, 2012).

A perda do controle proliferativo é o que caracteriza primariamente a carcinogênese. Para a formação de um tumor primário, as células cancerígenas devem coordenar um remodelamento do próprio tecido e uma transformação do tecido adjacente, com o objetivo de permitir o crescimento tumoral e invasão local. No nível do organismo, a doença afeta a homeostase global, induzindo alterações metabólicas sistêmicas. É neste estágio sistêmico da doença que, por fim, o paciente depara-se com a morte (MARKERT; LEVINE; VAZQUEZ, 2012).

Os estágios de promoção e progressão da doença dependem, em grande parte, de três fatores: *i*- a habilidade do tumor de desenvolver-se em um ambiente cronicamente inflamado; *ii*- a sua habilidade em evadir o reconhecimento do sistema imune e; *iii*- a habilidade de suprimir a resposta imunológica.

Diversos estudos apontam, tanto em modelos experimentais de câncer em murinos, como em diversos tipos de cânceres em humanos, que o desenvolvimento da doença e a sua resposta à terapia são moduladas pelo microambiente inflamatório e pelo sistema imune. A ligação entre inflamação e câncer é, desta forma, bem documentada: Diversas doenças inflamatórias aumentam o risco de câncer. Reciprocamente, em tumores epidemiologicamente não relacionados a manifestações inflamatórias (como o câncer de mama), as células tumorais podem orquestrar a produção de moléculas pró-inflamatórias e o recrutamento de células que medeiam a inflamação. Este cenário influencia quase todos os aspectos da progressão tumoral, incluindo sua habilidade em metastatizar (MANTOVANI et al., 2010).

As habilidades de evadir o sistema imune e de suprimir a resposta imunológica relacionam-se com o processo pelo qual o sistema imune perde a capacidade de reconhecer células pré-cancerígenas e destruí-las (“imuno-vigilância”) e com a capacidade do tumor em ativamente subverter os componentes imunológicos, utilizando-os em favor próprio (“imunossupressão”).

Evidências que contribuem para a aceitação desses conceitos apoiam-se no fato de que camundongos deficientes em linfócitos são mais susceptíveis tanto à carcinogênese espontânea quanto induzida. Adicionalmente, pacientes imunodeprimidos, em consequência da AIDS (em português - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou pós-transplantados, também apresentam maior incidência de diversos tipos de tumor, incluindo tumores de pulmão, tumores linfóides e relacionados a infecções virais, como sacoma de Kaposi (vírus humano da herpes 8) e carcinomas anogenitais (papilloma vírus humano, HPV) (CAVALLO et al., 2011; GRULICH et al., 2007; SHANKARAN et al., 2001).

Entretanto, no governo de todos os aspectos fenotípicos do câncer, desde os elementos macro, como as respostas imuno-fisiológicas, histo-patológicas, entre outras; passando pela intensa comunicação parácrina existente entre os diferentes tipos celulares que ocupam o tumor, até os eventos moleculares iniciais de transformação que levam uma célula normal a tornar-se cancerígena ou, em última instância, a própria resposta tumoral aos tratamentos quimioterápicos e o desenvolvimento da quimioresistência; no controle de todas essas características encontram-se as mudanças no genoma das células, conferindo-lhes vantagens adaptativas. Esta tese preocupa-se, assim, com a investigação dos mecanismos de reparo de DNA, envolvidos na remoção de danos, e respostas celulares induzidas por determinados quimioterápicos.

1.2. Respostas aos Danos no DNA

A informação genética das células é carregada pelo DNA, uma molécula vulnerável e dinâmica, e não uma molécula rígida e estável, como se poderia pensar. Inúmeros agentes físicos e químicos, tanto de origem endógena quanto ambiental, estão continuamente a desafiar a sua integridade (HOOGERVORST; VAN STEEG; DE VRIES, 2005). A replicação nas células de mamíferos é um processo de alta fidelidade que assegura uma transmissão adequada do material genético para as células filhas. Alterações no DNA de células somáticas – desde mutações pontuais, que afetam apenas um par de bases, até grandes deleções ou rearranjos – tendem a aumentar com o tempo e são primariamente responsáveis pelo aumento do risco de câncer (DONEHOWER, 2009; WIJNHOFEN et al., 2007).

O primeiro mecanismo induzível capaz de lidar com os danos no DNA descoberto foi o sistema SOS em *Escherichia coli*. Em *E. coli*, as funções SOS são um sistema regulatório que envolve diversas respostas celulares induzidas pelo tratamento com agentes genotóxicos (AKSENOV, 1999). O regulon SOS é constituído por mais de 20 genes distribuídos por todo o cromossomo da bactéria (FRIEDBERG, 1995). Em condições fisiológicas, a expressão dos genes SOS está bloqueada pela ação do repressor LexA, que reprime os seus genes-alvo pela ligação a um trecho de 20 pb (pares de bases), denominado SOS *box*. Os SOS *boxes* são operadores dos promotores desses genes e, como *lexA* está sujeito também a repressão autógena, possui dois SOS boxes adjacentes (MICHEL, 2005).

Muitos agentes genotóxicos são capazes de induzir a resposta SOS, como a radiação UV (ultravioleta), agentes alquilantes, agentes produtores de ligações cruzadas (“*cross-links*”) e até mesmo a privação de timina. Presume-se que o sinal indutor seja regiões de DNA em fita simples geradas na tentativa de replicação de moldes danificados ou pela interrupção da replicação normal. Este sinal ativa a proteína RecA, que também está sob o efeito de LexA. RecA ativada é capaz de promover a auto-clivagem do produto do gene *lexA*, permitindo a desrepressão dos genes que estavam sob o seu controle; quando o sinal indutor cessa, a proteína LexA não é mais clivada, voltando a reprimir novamente a expressão daqueles genes (AKSENOV, 1999).

Embora todas as funções SOS sejam, provavelmente, induzidas por um mecanismo comum, elas não se desreprimem simultaneamente. Essas diferenças na cinética de desrepressão talvez possam ser explicadas por diferentes graus de afinidade do repressor ao operador ao qual ele se fixa. As respostas SOS incluem a recombinação genética (*recA* ou *ruvAB*), reparo por excisão (*uvrA*, *uvrB*), inibição da divisão celular (*sulA/sfiA*) e a reparação mutagênica (*umuDC*) (MICHEL, 2005).

Em células de mamíferos, a habilidade das nossas células em responder corretamente às injúrias e manter a integridade do genoma é de fundamental importância para a sua proteção contra

mutações cromossômicas, mutações gênicas, a morte celular e o desenvolvimento de neoplasias. Para manter a integridade genômica e assegurar uma transmissão adequada da informação genética para seus descendentes, a célula é equipada com uma grande variedade de mecanismos de defesas. O conjunto desses mecanismos é denominado “respostas ao dano no DNA” (DDR – “*DNA Damage Response*”) e atuam no sentido de ativação da transcrição gênica, coordenada especialmente por *TP53*, no controle do ciclo celular, através de pontos de checagem (“*checkpoints*”), na indução do reparo do DNA ou na tolerância aos danos e de vias apoptóticas (BARTEK; LUKAS, 2001a, b; LIANG et al., 2009). Esses elementos serão abordados a seguir.

1.2.1 *TP53: O guardião do genoma e suas múltiplas facetas*

Em 1979, a descoberta de P53 como uma proteína capaz de ligar-se ao antígeno T do vírus SV40 e que se encontrava em quantidade aumentada em células tumorais levou os cientistas da época à acreditarem que estavam lidando com uma oncoproteína (DELEO et al., 1979).

Este achado marcou o início de uma era dinâmica na pesquisa do câncer, com grande impacto na clínica. *TP53* foi posteriormente estabelecido como um gene supressor de tumor chave, cuja relevância pode ser ilustrada pelo fato de que aproximadamente 50% dos tumores humanos apresentam mutações neste gene e pelo fato de que o seu *status* pode ter uma forte influência na sensibilidade dos tumores às drogas quimioterápicas e à radioterapia comumente empregadas nas terapias tumorais (FARNEBO; BYKOV; WIMAN, 2010; MEULMEESTER; JOCHEMSEN, 2008; SOUSSI; WIMAN, 2007).

Hoje, *TP53* é considerado um importante marcador tumoral e um potencial alvo terapêutico. A supressão tumoral mediada por *TP53* pode se dar de diferentes formas, dependendo do contexto. Por exemplo, a expressão contínua de oncogenes *in vivo* pode levar células proficientes em *TP53* a passarem de um estado proliferativo a um estado terminal e irreversível denominado “senescência induzida por oncogenes” (LARSSON, 2011). Este mecanismo é capaz de proteger camundongos do desenvolvimento de câncer de próstata e também ocorre em fibroblastos humanos e células epiteliais de mama (ALIMONTI et al., 2010; BARTKOVA et al., 2006; ZEMSKOVA et al., 2005). *TP53* também é capaz de suprimir o desenvolvimento de tumores por iniciar um programa de morte ativa, a apoptose. Seu papel como “guardião do genoma” ainda inclui a coordenação das respostas celulares na presença de agentes genotóxicos, induzindo uma parada no ciclo celular para permitir que a célula tenha tempo de se recuperar das injúrias antes de se dividir e induzindo os programas genéticos que sejam aptos a lidar com os danos – evitando, desta forma, a instabilidade genômica (MEEK, 2009).

Enquanto a perda de *TP53* em células somáticas rende especificamente ao tecido uma susceptibilidade aumentada ao câncer, mutações neste gene em células germinativas- cuja frequência é de apenas 1:5000 indivíduos- podem acarretar em uma prole cujos indivíduos apresentam uma alta probabilidade de desenvolverem diversos tipos de câncer precocemente, ainda na infância. O conjunto das manifestações clínicas desses pacientes foi denominada Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), caracterizada geneticamente como uma desordem autossômica dominante. Curiosamente, o espectro de tumores encontrados nesta síndrome familiar difere bastante dos tumores associados com mutações somáticas de *TP53*, tipicamente epiteliais. Os tipos mais comuns em SLF são tumores mais raros, como sarcomas, tumores cerebrais, leucemias e carcinomas da adrenocortical (IWAKUMA; LOZANO; FLORES, 2005; MALKIN, 2011; ROYDS; IACOPETTA, 2006).

TP53 tem outros dois genes homólogos: *P63* e *P73*. Esta família de genes teve mantida suas características estruturais e funcionais conservadas há mais de um bilhão de anos de evolução. Do ponto de vista evolutivo, o gene ancestral desta família pôde ser primeiramente detectado nas anêmonas marinhas. Este gene ancestral é encontrado em quase todos os invertebrados e a primeira duplicação que originou *TP53* e *P63/P73* se deu nos peixes cartilaginosos. A partir dos peixes ósseos, no entanto, já é possível encontrar os três genes (BELYI et al., 2009; CASTRO et al., 2008; DOTSCH et al., 2010).

Os genes *TP53*, *P63* e *P73* encontram-se localizados nas regiões cromossômicas 17p13.1, 1p36.32 e 3q28, respectivamente. *P63* e *P73* podem afetar a atividade de *TP53* e também participam na sinalização para a apoptose. Porém, embora compartilhem também uma grande semelhança funcional, até agora se tem poucas evidências de que *P63* e *P73* sejam também supressores tumorais (YANG et al., 2002). Camundongos deficientes nestes genes não apresentam o desenvolvimento precoce de tumores como os animais mutantes em *TP53*, embora apresentem problemas no desenvolvimento, de regeneração tecidual, problemas neurológicos e inflamatórios. (ALLOCATI; DI ILIO; DE LAURENZI, 2012; YANG et al., 1999; YANG et al., 2000).

Em humanos, a proteína *TP53* é um fator de transcrição que contém 393 aminoácidos, 53 KDa, consistindo de cinco domínios estruturais e funcionais (CHO et al., 1994). O *domínio N-terminal ácido* de transativação transcricional é requerido para ativação dos genes induzíveis. O *domínio central* de ligação ao DNA (DBD- “DNA Binding Domain”) facilita a ligação sequência-específica de *TP53* aos elementos responsivos (RE- “Responsive Elements”) a *TP53* no DNA. Neste domínio se encontram mais de 97% das mutações encontradas em humanos. O *domínio de tetramerização* facilita a interação dos monômeros de *TP53* para formar dímeros e a interação entre os dímeros para formar os tetrâmeros. Esta tetramerização é essencial para a habilidade de *TP53* regular positivamente a expressão gênica. Esses três domínios contribuem para a ativação de um

grande número de alvos, incluindo *P21* e proteínas pró-apoptóticas, como *BAX*, *PUMA* e *NOXA* (MIRZAYANS et al., 2012).

Além de induzir a expressão gênica, TP53 também regula negativamente a transcrição de vários genes, incluindo os que codificam para *BCL-2*, *MCL-1* e *SURVIVIN* (supressores da apoptose), além de *MDR-1* (“*Multidrug Resistance*”), que confere um fenótipo multirresistente a drogas. Essa propriedade é associada ao *domínio rico em prolina* localizado entre as regiões dos domínios de transativação e de ligação ao DNA e ocorre indiretamente pela ativação transcricional de proteínas repressoras (AKHTAR et al., 2006; HOFFMAN et al., 2002). Finalmente, o *domínio C-terminal* contém o domínio básico, capaz de interagir com o DNA de uma forma independente da especificidade da sequência (FOORD et al., 1991).

O gene TP53 é composto por 11 exons e 10 introns. Ainda, apresenta duas regiões promotoras, sendo que o segundo promotor localiza-se internamente, no íntron 4. Imprimindo um grau maior de complexidade, doze isoformas da proteína são reconhecidas, obtidas através do uso alternativo do segundo promotor, do *splicing* alternativo e através do uso de um códon alternativo na iniciação da translação (KHOURY; BOURDON, 2010; KHOURY; BOURDON, 2011; MARCEL et al., 2010). Algumas isoformas são ativas para a ligação ao DNA dependente da sequência, portanto aptas para mediar a transativação gênica associada; porém não apresentam a atividade apoptótica mediada pela proteína completa (BOURDON et al., 2005; ROHALY et al., 2005). Assim, por apresentar isoformas com diferentes funções, a expressão de cada uma delas pode resultar em consequências distintas. De fato, as isoformas têm um padrão diferente de expressão entre os diversos tecidos, entre o tumor e o seu tecido normal de origem e entre diferentes tipo tumorais (OKUMURA et al., 2011).

Sob circunstâncias normais, *TP53* selvagem é mantido em concentrações muito baixas na célula e está presente basicamente em sua forma inativa. Em células que estão se proliferando, sua meia vida é limitada a minutos, enquanto na resposta ao estresse pode ser prolongada por horas. Os níveis de *TP53* e sua atividade na célula dependem de fatores intrínsecos e de estímulos extrínsecos. Em condições de estresse, a ativação de *TP53* é governada por uma rede complexa de modificações pós-translacionais, que incluem fosforilação, acetilação, ADP-ribosilação, ubiquitinação e sumoilação. A maior parte dessas modificações ocorrem nas regiões N e C-terminal (REISMAN et al., 2007; OREN; BARTEK, 2007).

A fosforilação e a acetilação são as modificações mais comuns e podem estar correlacionadas. Tanto a fosforilação quanto a acetilação de TP53, além de aumentar a estabilidade proteica e o acúmulo da proteína no núcleo, também aumenta sua afinidade por ligação ao DNA. Muitas quinases têm sido implicadas na fosforilação de TP53 e vários sítios podem ser fosforilado por mais de uma quinase. Por exemplo, a fosforilação na Ser15 é mediada

por ATM/ATR, tanto de forma direta quanto indireta, através de CHK1/CHK2 (BAI; ZHU, 2006; DAS et al., 2008).

A fosforilação do domínio N-terminal induzida por estresse aumenta a estabilidade de TP53 por induzir sua dissociação de seu regulador negativo, MDM2. Por exemplo, a Ser15, Thr18 e Ser20 estão localizadas no sítio de ligação a MDM2 e são fosforiladas em resposta a danos no DNA (LI et al., 2006). Diversas lisinas localizadas na região C-terminal também podem ser acetiladas em resposta ao estresse. Os resíduos acetilados estão em sua maior parte localizados no domínio regulatório, adjacente ao domínio de tetramerização. Duas histonas acetiltransferases (HATs) são capazes de acetilar TP53: p300 e CBP (REISMAN et al. 2012; VOUSDEN; PRIVES, 2009).

Em contrapartida, pouco se sabe sobre as outras formas de modificações translacionais sofridas por TP53. Embora a ubiquitinação seja corriqueiramente utilizada como um marcador proteico para degradação proteassômica, a ubiquitinação da Lys320 de TP53 pela E3 ubiquitina ligase E4F1 compete com a acetilação mediada por CBP e acarreta na ativação de genes ligados à parada no ciclo celular. Outras evidências mostram que a Ser376 e Thr55 são defosforiladas em células expostas a radiação ionizante, indicando que a defosforilação pode contribuir para a ativação de TP53. Da mesma forma, demonstrou-se que a defosforilação de TP53 está associada com o aumento da expressão de P21 juntamente com aumento da atividade da caspase 3 e da indução de apoptose, em células estimuladas com TGF- β (DAS et al., 2008).

Uma gama de mutantes no DBD de TP53, embora não tenham qualquer atividade de transativação, são capazes de induzir a apoptose (HAUPT et al., 1995; KAKUDO et al., 2005). Aliás, curiosamente, a ativação de TP53 é capaz de induzir apoptose mesmo na ausência do núcleo (CHIPUK et al., 2003). De modo contrário, camundongos quiméricos portadores de mutações que não afetam DBD, mas afetam outros domínios, são capazes de induzir senescência, mas incapazes de disparar a apoptose (JOHNSON et al., 2008). Essas evidências apontam para o fato de que o *pool* citoplasmático de TP53 pode induzir apoptose independentemente do mecanismo de transativação.

Estes fatos sugerem um segundo tipo de controle da atividade de TP53: através da sua localização sub-celular. Em células normais (não transformadas), TP53 apresenta uma localização citoplasmática. Com a progressão do ciclo celular, tende a se acumular no núcleo até a fase S, quando retorna ao citoplasma (RYAN et al., 1994; SHAULSKY; BEN-ZE'EV; ROTTER, 1990).

Este tráfego é finamente regulado *via* sinais de importação e exportação nucleares. O domínio regulatório C-terminal contém tanto as sequências do sinal de localização nuclear (NLS- “*Nuclear Localization Signal*”) quanto o sinal de exportação nuclear (NES- “*Nuclear Exportation Signal*”). O NLS é composto basicamente por um cluster de aminoácidos básicos e é iniciado pela

ligação de complexos proteicos específicos, como as importinas α/β . A translocação de TP53 para o núcleo é terminada pela dissociação do complexo NLS/importinas α/β . O NES é, por outro lado, composto por sequência conservada rica em leucinas e sua exportação requer a ligação da proteína exportina 1. A proteína apresenta duas sequências de NES: uma localizada no domínio de tetramerização, sugerindo que a tetramerização de TP53 inibe seu aporte para o citoplasma, e o outro, localizado na região de ligação a MDM2 (FERECATU et al., 2009; LIANG; CLARKE, 1999; LIANG; CLARKE, 2001; LIANG; HONG; CLARKE, 1998; STOMMEL et al., 1999; SHAULSKY et al., 1990).

Alguns estudos sugerem que durante a apoptose, uma pequena porção de TP53 também transloca-se para a mitocôndria, em sinergismo à sua translocação ao núcleo, onde interage com uma gama de proteínas (MARCHENKO; ZAIKA; MOLL, 2000; MIHARA et al., 2003). A localização de TP53 na mitocôndria induzida por estresse rompe a integridade da membrana interna desta organela, pela formação de um complexo com a proteína ciclophilin D, um componente do PTP (“*Permeability Transition Pore*”) normalmente encontrado neste local. De modo geral, acredita-se que as modificações pós-translacionais estejam envolvidas nestes processos, sendo que as fosforilações contribuem tanto para os processos de importação e exportação do núcleo, as acetilações e ubiquitinações na exportação do núcleo e as ubiquitinações no vai e vem da proteína pela mitocôndria (LIU et al., 2008; MIHARA et al., 2003; MARCHENKO; MOLL, 2007; FERECATU et al., 2009; WOLFF et al., 2008).

No entanto, ainda é um desafio entender as diferentes modificações sofridas por TP53 e as interações proteicas que influenciam nas decisões sobre o destino da célula. Por isso, seus mecanismos de indução de parada do ciclo celular, seus alvos de ativação transcricional na indução do reparo e sua função na apoptose serão ilustrados nas sessões a seguir, em seus devidos contextos.

1.2.2 Checkpoints do ciclo celular: cada passo a seu tempo

O papel biológico das moléculas de DNA exige que elas possuam duas propriedades fundamentais: auto-replicação e preservação da informação genética. É indispensável, tanto para manutenção da viabilidade celular quanto para a preservação da própria espécie, que haja fidelidade na replicação semiconservativa do DNA; em humanos, essa tarefa seria impossível sem a existência de mecanismos eficazes para coordenar e assegurar a cópia do material genético.

O ciclo celular somático é dividido didaticamente em quatro fases, sendo que as mais críticas são a fase S (fase de síntese de DNA) e a fase M (ou fase mitótica). As fases S e M são separadas por duas fases de lacuna ou *gap* (G1 e G2), que controlam a prontidão da célula para

entrar em S ou M, respectivamente (Suryadinata, Sadowski e Sarcevic, 2010). A progressão do ciclo envolve muitos eventos coordenados que vão desde mudanças nos componentes celulares, como a síntese de proteínas e RNAs, às complexas vias protéicas de sinalização extra e intracelulares, que determinarão se a célula deve ou não ultrapassar para a próxima fase cronológica do ciclo (MOSER; RUSSELL, 2000; MURRAY; KIRSCHNER, 1991).

O ciclo celular eucariótico é um processo evolutivamente conservado que regula a divisão celular desde simples organismos unicelulares, como leveduras, até organismos multicelulares superiores, como os humanos. Em humanos, quando uma célula passa de maneira imprópria de uma fase para outra de maneira contínua, ou seja, sem que a fase anterior tenha sido completada com sucesso e/ou impedindo que eventos posteriores ocorram prematuramente, o ciclo celular pode ser dirigido a formar uma massa de células onde deveria existir apenas uma. Desta forma, existe uma relação básica, no entanto complexa, entre ciclo celular e câncer. (AMES; GOLD, 1991; BENHAMOU; SARASIN, 2000; MURRAY; KIRSCHNER, 1991; PIETENPOL; STEWART, 2002; PINES, 1995).

A progressão pelo ciclo celular é monitorada por *checkpoints*. As células param em vários *checkpoints* antes de transitar por fases cruciais, para interpretar suas condições internas e ambientais via controles por *feedbacks*. O controle cronológico de cada fase se dá através da modulação da atividade de moléculas denominadas ciclinas e ciclinas dependentes de quinases (CDKs – “*Cyclins-Dependent Kinases*”) (FIGARELLA-BRANGER et al., 1998; KAMB, 1995).

Todas as fases apresentam pontos de checagem, conhecidos como *checkpoints* em G1/S, e G2/M. Outro *checkpoint* importante é o do fuso mitótico, que atrasa a anáfase quando este apresenta defeitos (DAI; GRANT, 2010). Em células *não estressadas*, o comprometimento da replicação dos cromossomos ocorre na fase G1, num momento determinado de ponto de restrição; e o comprometimento para a divisão mitótica ocorre no final de G2. As células gastam a maior parte de seus ciclos em G1 e é a duração de G1 que é ajustada em resposta às condições de crescimento. Quando uma célula ultrapassa G1 sem acidentes, ela completará a fase S, procederá por G2 e se dividir (SHACKELFORD; KAUFMANN; PAULES, 1999).

Em G1, há a disponibilidade de mitógenos e as condições ambientais são favoráveis à proliferação. O ponto de restrição é caracterizado por uma mudança no painel molecular da célula, quando a dependência de fatores de crescimento dá lugar a uma fase subsequente, independente de mitógenos e acompanhada por uma ampla indução de programas transcricionais regulados em paralelo pelas vias da proteína retinoblastoma (RB) e de MYC. Estas regulam genes críticos para a transição G1/S e a coordenação da progressão S/G2/M. Na via de RB, as trocas moleculares se dão pela fosforilação da proteína por uma quinase ‘Ciclina D/CDK4’, resultando na desrepressão dos fatores de transcrição regulados por ela (RB). E2F é um fator de transcrição regulado por RB que, juntamente com Myc ativa o gene da Ciclina E, necessária para a ativação

da quinase CDK2 e o início da replicação de DNA (BARTEK; LUKAS, 2001a; b; SHAPIRO, 2006).

Quando a célula adentra a fase S, a síntese de DNA é iniciada através do disparo (“*firing*”) de múltiplas origens de replicação (RO- “*Replication Origins*”) pelo genoma. As RO não são iniciadas de forma sincronizada, mas ativadas ao longo da fase S de acordo com o programa temporal estabelecido em G1 (YEKEZARE; GOMEZ-GONZALEZ; DIFFLEY, 2013).

O *checkpoint* de fase S manifesta-se como um decréscimo na taxa de síntese de DNA. Por causa da complexidade das transações que são inerentes ao processo de replicação, uma miríade de tipos de erros e lesões podem ocorrer espontaneamente, tornando a fase S indiscutivelmente o período mais vulnerável do ciclo celular. Proteger a integridade do genoma durante essa fase crítica é, desta forma, de máxima importância e um grande volume de dados tem indicado que os *checkpoints* da fase S são mais significativos para prevenir a instabilidade genética que os *checkpoints* de G1 ou G2, ou ainda do que o *checkpoint* de fuso mitótico (BARTEK; LUKAS; LUKAS, 2004; KASTAN; BARTEK, 2004; KAUFMANN; PAULES, 1996).

Distinguem-se, na fase S, três pontos de checagem, que são coordenados de forma muito próxima e compartilham alguns componentes: um *checkpoint* dependente da replicação, que ocorre quando a forquilha de replicação torna-se bloqueada, seja por uma depleção no estoque de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), por uma inibição da DNA polimerase ou pela colisão da forquilha com um fragmento de DNA danificado ou aberrante; um *checkpoint* independente da replicação, induzido por quebras duplas no DNA (DSBs- “*Double Strand Breaks*”) em regiões diferentes das forquilhas de replicação (denominado intra-S); e o *checkpoint* S/G2, que garante que a célula não entre em divisão antes que todo o genoma esteja completamente duplicado. Uma falha neste ponto resulta em uma mitose catastrófica. A inibição da atividade de CDK2 pela degradação de Cdc25 parece importante tanto na regulação de G1 quanto na resposta intra-S e resulta em horas de atraso na progressão do ciclo em S (BARTEK; LUKAS, 2001a, b; BARTEK; LUKAS; LUKAS, 2004; JONES; PETERMANN, 2012).

Por fim, o *checkpoint* de G2/M tem a capacidade de impedir que a célula entre em mitose se o seu genoma não se encontra devidamente replicado e garante tempo para a organização da maquinaria mitótica. Ele é capaz de prevenir a mitose pela inibição da quinase ‘Ciclina B/Cdc2’, também conhecida como fator promotor de fase M (MPF- “*M phase Promoting Factor*”) (KASTAN; BARTEK, 2004).

Na mitose propriamente dita, o *checkpoint* de montagem do fuso assegura que as células não entrem na anáfase (quando a segregação cromossômica acontece) até que os cromossomos estejam alinhados no equador da célula e ligados aos microtúbulos do fuso mitótico. O complexo promotor da anáfase ou ciclosomo (APC/C) regula a degradação, pelo proteassomo, de inúmeras

proteínas que regulam a coesão das cromátides irmãs, a elongação do fuso e também a Ciclina B1 (MANCHADO; EGUREN; MALUMBRES, 2010).

No entanto, na presença de agentes capazes de perturbar a replicação, a via de DDR é ativada e outras moléculas passam a protagonizar o controle do ciclo celular. Essa via de sinalização de danos no DNA podem ter seus componentes classificados em sensores, mediadores, transdutores e efetores. De modo geral, após o dano no DNA, complexos multiprotéicos reconhecem-no e recrutam ‘transdutores proximais’ (geralmente ATM e ATR) para a lesão, onde são inicialmente ativados. ATM e ATR transduzem sinais para ‘transdutores distais’, geralmente CHK2 e CHK1, respectivamente. Paralelamente, a ativação de ATM/ATR e a fosforilação de sensores mediada por elas é capaz também de recrutar e fosforilar ‘mediadores’, como FANCD2 e H2AX. Os transdutores distais ativados fosforilam moléculas ‘efetoras’, cujas funções relacionam-se com a regulação transcricional (por exemplo, E2F, BRCA1 e TP53), reparo de DNA (como NBS1, ARTEMIS, H2AX, BLM1, BRCA1 e TP53), apoptose (como TP53, MDM2, E2F1, CHK1 e PML1) e remodelamento da cromatina (TLK1/2). O *checkpoint* de danos no DNA protege, portanto, as células dos ataques de agentes genotóxicos que podem introduzir alterações nas moléculas de DNA (**Figura 1**) (DAI; GRANT, 2010; POEHLMANN; ROESSNER, 2010).

Figura 1 Vias de sinalização na presença de danos no DNA. Transdutores proximais, distais e moléculas efetoras, que regulam a parada do ciclo celular e coordenam mecanismos relacionados ao reparo do DNA, tolerância ou indução de morte.

O mecanismo pelo qual TP53 induz uma parada em G1 é relativamente bem entendido. TP53 induz a transcrição de *P21*, que é uma proteína inibidora de CDK (CKI – “*Cyclin Kinase Inhibitor*”). Níveis elevados de P21 inibem as quinases ‘Ciclina E/cdk2’ e ‘Ciclina A/cdk2’, impedindo que essas promovam a progressão do ciclo. (BLATTNER, 2008; CHIPUK et al., 2003; LAKIN; JACKSON, 1999; QIAN; CHEN, 2010).

Na fase S, a regulação negativa de Cdc7, uma quinase envolvida no disparo das RO, leva fibroblastos humanos à uma parada na fase S. Após a diminuição de Cdc7, nota-se um aumento da expressão de TP53 (embora não fosforilado na Ser15), seguido de um aumento de P21. Esses resultados sugerem que TP53 é necessário para a manutenção da parada do ciclo induzido por Cdc7 (MONTAGNOLI et al., 2004). De fato, quando células mutadas em TP53 são tratadas com inibidores da replicação (afidicolina ou hidroximiureia), elas mantêm a capacidade de entrar em mitose, após uma longa parada em S. No entanto, essas células apresentam um conteúdo de DNA inferior a 4N, indicando que TP53 assegura que a célula não entre em mitose sem que

tenha todo o seu DNA duplicado. Quando TP53 é restaurado, embora uma fração das células entrem em apoptose, a replicação completa é resgatada (MONTAGNOLI et al., 2008; TAYLOR et al., 1999).

Um dado muito interessante é o de que uma das isoformas de TP53, produto do *splicing* dos exons 7 e 9 (Δ TP53), é capaz de ligar-se aos promotores e transativar genes associados à parada no ciclo, em particular P21 e 14-3-3 σ , mas não é capaz do mesmo em relação aos genes apoptóticos, como PIG3. Ainda: Δ TP53 só é ativa durante a fase S em células em G1/S irradiadas com UV, enquanto a proteína completa é inativa. Este fato reconcilia duas idéias aparentemente opostas: a idéia de que a presença de TP53 na fase S seria deletéria (devido à indução da apoptose) com os estudos que mostram que TP53 é importante no *checkpoint* de fase S (ROHALY et al., 2005).

O complexo da Ciclina B1/Cdc2 é o principal alvo do checkpoint em G2/M e envolve a ativação de ATM e ATR e seus substratos, CHK1 e CHK2 (NYBERG et al., 2002). CHK1 e CHK2 têm como alvo Cdc25 que, quando fosforilada, associa-se com as proteínas 14-3-3. Estas obstruem seu NLS, inibindo seu aporte para o núcleo. Adicionalmente, foi demonstrado que TP53 liga-se diretamente ao promotor de Cdc25 após danos no DNA (LOPEZ-GIRONA; KANOHI; RUSSELL, 2001; ST CLAIR et al., 2004). Além disso, 14-3-3 σ também é alvo de TP53, sendo regulado positivamente. 14-3-3 σ evita a localização de MFP no núcleo após o dano, previndo a entrada do ciclo na mitose (HERMEKING et al., 1997; LOPEZ-GIRONA et al., 1999).

Na mitose, defeitos no fuso e a presença de cinetócoros não conectados resultam na inativação do complexo promotor da anáfase ou ciclosomo (APC/C). A falha neste *checkpoint* pode levar as células a saírem da mitose e entrarem em uma nova fase S com um conteúdo 4N, resultando em endoreduplicação (MANCHADO; EGUREN; MALUMBRES, 2010). Neste contexto, vários experimentos mostram que TP53 tem um papel essencial na prevenção de aneuploidias, evitando a reendoduplicação das células tetraplóides que resultam da mitose. Essa conclusão é baseada na evidência direta de que o tratamento de fibroblastos deficientes em TP53 com inibidores do fuso mitótico leva a uma falha neste *checkpoint*, acarretando um segundo ciclo de replicação do DNA e, por fim, em células octaplóides (DIX et al., 1999).

1.2.3 *Reparo de DNA: consertando erros*

Para lidar com os efeitos deletérios aos quais o genoma está exposto, a célula é equipada com uma grande variedade de mecanismos de reparo de DNA que, em conjunto, estão preparadas para lidar com a maior parte das lesões, sejam elas espontâneas ou induzidas, que ocorram, virtualmente, em qualquer fase do ciclo. A importância desses mecanismos pode ser melhor evidenciada por certas desordens em que esses aparatos de proteção estão ausentes ou não funcionais:

- As síndromes *Xeroderma Pigmentosum* (XP), Cockayne (CS) e Tricotiodistrofia (TTD) são desordens autossômicas recessivas causadas por uma via comum no reparo do DNA, mas que, curiosamente, apresentam características clínicas bem diferentes:

A síndrome XP foi descoberta em 1882 por Hebra e Kaposi. A incidência dela pode variar entre 1:20.000 no Japão, até 1:250.000 nos EUA e 1:500.000 na Europa Ocidental (LEHMANN; MCGIBBON; STEFANINI, 2011). Indivíduos portadores de XP apresentam extrema sensibilidade à luz solar, com um risco 1.000 vezes aumentado de desenvolverem cânceres de pele (em áreas expostas ao sol) e também outros tipos de cânceres, quando comparados com a população em geral (LEITE et al., 2009; TORNALETTI, 2009).

Metade dos pacientes costuma ter um histórico de queimaduras na pele à mínima exposição solar, além de xerose (pele seca) e do desenvolvimento de sardas. Seus olhos também podem desenvolver processos inflamatórios, conjuntivites e queratites, devido à exposição crônica a luz solar. Embora apresentem um desenvolvimento sexual normal, 25% dos pacientes apresenta degeneração neurológica progressiva, com atrofia cerebral e cerebelar. Consequentemente, podem apresentar perda auditiva, problemas para caminhar, engolir, etc. e necessitar de assistência para realizar essas atividades (LAI et al., 2013).

A CS foi descrita mais tardiamente em relação à XP, em 1933, pelo médico londrino Edward Cockayne. A incidência da doença é de aproximadamente 1:250.000 (KLEIJER et al., 2008). Esses pacientes têm defeitos no desenvolvimento, incluindo um severo retardo mental e físico, microcefalia, membros longos, aspecto característico do rosto com nariz em forma de bico de papagaio, retinite pigmentosa, atrofia óptica, envelhecimento precoce e sensibilidade ao sol. Esta sensibilidade, porém, é manifestada apenas como uma urticária intensa, sem qualquer mudança na pigmentação da pele ou desenvolvimento de câncer, como visto em XP (BERNEBURG; LEHMANN, 2001; LEHMANN, 2003).

Já a TTD foi descrita pela primeira vez em 1971. Sua prevalência é de 1:1.000.000. Todos os pacientes TTD exibem cabelos e pêlos esparsos, secos e quebradiços, caracterizados por um baixo conteúdo de enxofre e cisteína e por apresentarem um padrão de coloração típico por

faixas (denominado cauda de tigre), quando observado no microscópio. As anomalias do cabelo, que são consideradas as características mais marcantes da síndrome, estão associadas com um amplo espectro de sintomas clínicos que usualmente afetam órgãos de origem ectodérmica e neuroectodérmica (FERRANDO et al., 2012). Os sintomas normalmente incluem retardo mental e do crescimento, anomalias nas unhas, ictiose, microcefalia, dismorfismo facial, ocular, anormalidades esqueléticas, desenvolvimento das características sexuais secundárias afetado, infecções recorrentes e fotosensibilidade. Além destas, há relatos também de osteoporose, perda auditiva e catarata, entre outros elementos relacionados ao envelhecimento precoce (COSTA et al., 2003; LAMBERT; GAGNA; LAMBERT, 2010; MANCHADO; EGUREN; MALUMBRES, 2010; STEFANINI et al., 2010).

Defeitos genéticos em diferentes componentes da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER – “*Nucleotide Excision Repair*”) são as causas moleculares dessas doenças. A via de reparo de NER compreende pelo menos 30 genes e é caracterizada por sua habilidade em reconhecer e eliminar danos no DNA que causam grandes distorções na dupla-hélice, como as lesões induzidas por UV. Estudos de complementação permitiram uma classificação de XP em oito grupos (XPA- G e XPV- de variante, cuja mutação não ocorre em NER, mas em uma polimerase translesão) e, no caso de CS, em cinco grupos de complementação: CSA, CSB, XPB, XPD e XPG (CLEAVER; LAM; REVET, 2009).

Resumidamente, o modelo de ação de NER envolve apenas cinco passos básicos: o reconhecimento da lesão e abertura das fitas, duas incisões na fita envolvendo o dano, excisão do fragmento que contém o dano, preenchimento da lacuna e re-ligação. No entanto, NER divide-se em duas subvias, que diferem entre si apenas quanto às proteínas sensoras do dano e o local onde acontece o reparo: a subvia de GGR (GGR – “*Global Genomic Repair*”), que é capaz de atuar por todo o genoma, e de TCR (TCR- “*Transcription Coupled Repair*”), que dedica-se a remover as lesões que bloqueiam a transcrição e se dá especificamente em sítios transcricionalmente ativos (ARMELINI et al., 2007; COSTA et al., 2003; KLEIJER et al., 2008; MELLON et al., 1986; MELLON; SPIVAK; HANAWALT, 1987).

No contexto celular, a vigilância do genoma e o reconhecimento de lesões se dá pela via de GGR, pelo complexo XPC-hHR23B, em associação à proteína Centrin-2. É a proteína XPC em si que apresenta atividade de ligação ao DNA, enquanto a proteína de ligação a ubiquitina Rad23B e a proteína de ligação a cálcio Centrin-2 são importantes para evitar a degradação de XPC e estimular a atividade de reparo (**Figura 2**) (ARAKI et al., 2001; NISHII et al., 2005; SUGASAWA et al., 1998).

Figura 2. Esquema ilustrativo da via de GGR- NER. **1 e 2.** Lesão distorciva do DNA e Reconhecimento da lesão; **3.** Abertura das fitas (pelas helicases XPB e XPD, que são proteínas do complexo TFIIH) e estabilização da fita simples (oposta ao dano); **4.** Corte na região 5' ao dano. por XPF-ERCC1; Preenchimento da lacuna pela DNA Pol; **5.** Corte na região 3' ao dano, por XPG; Finalização do preenchimento da lacuna; **6.** Excisão completa do fragmento contendo o dano. Ligação do novo fragmento por uma DNA-ligase.

Diversas análises bioquímicas utilizando substratos de DNA definidos mostraram que XPC é muito mais um fator de ligação ao DNA estrutura-específico do que dano-específico. Como consequência, XPC tem um excelente potencial de reconhecer qualquer rompimento ou desestabilização do pareamento canônico de Watson e Crick, contribuindo para a grande versatilidade de NER (SUGASAWA et al., 2001; SUGASAWA et al., 2002).

No entanto, algumas lesões são bastante difíceis de serem reconhecidas por XPC, como é o caso dos CPDs (*“Cyclobutane Pyrimidine Dimers”*). Surpreendentemente, embora XPC não se ligue preferencialmente a essas lesões, foi demonstrado que a excisão delas utilizando extratos celulares é absolutamente dependente de XPC-hHR23B, em concordância com outras evidências que demonstravam que CPDs não são removidos em células mutantes XP-C. Essas evidências sugerem que outros fatores possam estar envolvidos no reconhecimento de algumas lesões ou que possa existir outra sub-via em GGR que, embora requeira XPC-hHR23B, não é iniciado por esta (KUSUMOTO et al., 2001; SUGASAWA et al., 2001; SUGASAWA et al., 2002). Neste sentido, tem-se sugerido que a proteína XPE (DDB2) coopere na detecção de certas lesões (HWANG et al., 1999; TANG et al., 2000). A ligação de XPC ao DNA induz, então, uma flexão neste e o arranjo aquitetônico decorrente é importante para a estabilização e recrutamento das outras proteínas envolvidas (JANICIJEVIC et al., 2003).

Já em sítios transcricionalmente ativos, o bloqueio da transcrição caracteriza um desafio para a integridade genômica e para a vitalidade celular. A não restauração da expressão gênica interfere com novos ciclos da transcrição e, posteriormente, com a replicação do DNA. Na via de TCR, o reparo das lesões que impedem a transcrição requer, num primeiro momento, a dissociação da RNAPII (RNA polimerase II) bloqueada da cromatina, de forma a liberar o acesso às proteínas de reparo ao sítio do dano (VERMEULEN; FOUSTERI, 2013).

Neste contexto, sabe-se que CSB interage de forma transiente com a RNAPII durante a elongação e que na indução de danos por UV esta interação é estabilizada, sugerindo que CSB aja num estágio bem inicial de reconhecimento do dano (VAN DEN BOOM et al., 2004). Algumas proteínas específicas de TCR foram envolvidas no aceleração do reparo dessas regiões bloqueadas, como UVSSA, USP7, XAB2, HMG1 e CSA, esta uma E3-ubiquitina ligase implicada na ubiquitinação de um ou mais fatores da via (AAMANN et al., 2013).

Depois do reconhecimento do dano, seja pela via de GGR ou TCR, a atividade sequencial das helicases XPB e XPD promovem a abertura da dupla hélice e a atividade das endonucleases ERCC1/XPF e XPG promovem duas incisões assimétricas nas regiões 5' e 3', respectivamente, que englobam o local da lesão. Paralelamente, XPA e RPA (*“Replication Protein A”*) são recrutadas ao sítio do reparo, a fim de estabilizar as regiões de DNA fita-simples geradas e retirar o oligonucleotídeo de aproximadamente 25 a 30 nucleotídeos que contém a lesão. O

preenchimento da lacuna pode se dar pelas DNA polimerases δ , ϵ e κ em cooperação com RFC (“*Replication Factor C*”) e PCNA (“*Proliferating Cell Nuclear Antigen*”), e o processo é completado por uma ligase, que pode ser (XRCC1)- DNA ligase III (LIG3) ou pelo complexo flap endonuclease 1 (FEN1)–DNA ligase I (LIG1) em células em divisão, ou em células quiescentes pela ligase XRCC1–LIG3 α (BENHAMOU; SARASIN, 2000; IYAMA; WILSON, 2013) (**Figura 2**).

- As imunodeficiências primárias (PIDs- “*Primary Immunodeficiencies*”) são desordens genéticas que predisõem o indivíduo a uma série de graves e frequentes infecções, autoimunidade e câncer. Em geral, estão relacionadas com defeitos na via de reparo de DSBs. Entre elas, encontra-se a Ataxia Telangiectasia (AT) - que apresenta uma mutação na proteína ATM (“*Ataxia Telangiectasia Mutated*”) - e a Síndrome de Nijmegen (NBS – “*Nijmegen Breakage Syndrome*”) – que apresenta uma mutação na proteína NBS1.

A AT é uma síndrome autossômica recessiva rara. As manifestações clínicas desta doença incluem ataxia cerebelar progressiva, telangiectasia óculo-cutânea, esterilidade, retardo do crescimento e uma alta incidência de tumores, especialmente linfóides. É caracterizada por uma hipoplasia ou mesmo ausência do timo, possivelmente devido ao desenvolvimento prejudicado. A imunodeficiência leva a frequentes infecções sino-pulmonares que podem evoluir para um problema pulmonar crônico (GENNERY, 2006; KUHNE et al., 2004; SALAVOURA et al., 2008).

Por outro lado, a NBS é reconhecida pela aparência facial característica, com a testa e mandíbula recuadas, maxila proeminente, prega epicântica, orelhas grandes, cabelos ralos, microcefalia e retardo mental moderado. Os pacientes são susceptíveis a tumores cerebrais e linfomas, particularmente linfomas de células-B, e propensos a infecções, principalmente do trato respiratório (GENNERY, 2006; JONGMANS et al., 1997; KRAAKMAN-VAN DER ZWET et al., 1999).

DSBs representam uma forma séria de dano, podendo levar a erros na replicação, perda ou rearranjo genômico e eventualmente morte celular ou carcinogênese (SALAVOURA et al., 2008). As DSBs podem ser geradas por erros durante a própria replicação, induzida por agentes genotóxicos ou ainda produzida por atividades enzimáticas programadas durante a meiose ou da recombinação V(D)J (responsável pela diversidade de imunoglobulinas do nosso organismo). Após a quebra de ambas as fitas do DNA, as respostas celulares são ativadas pela proteína ATM, que é da família PIKK (“*Phosphatidylinositol 3-Kinase related Kinase*”). A partir de então, o reparo propriamente dito poderá ocorrer por duas vias, dependendo da fase do ciclo em que a célula se encontra: em mamíferos, a recombinação homóloga (HR) está geralmente limitada às fases S e G2, enquanto o reparo não homólogo (NHEJ- “*Non-Homologous End Joining*”) pode ocorrer em qualquer fase do ciclo (GENNERY, 2006; NAHAS; GATTI, 2009).

ATM é um componente central de transdução de sinal de DSBs, e, apesar de sua ativação ocorrer rapidamente após o dano, o complexo MRN (MRE11, RAD50 e NBS) é encontrado no sítio imediatamente após ele tenha acontecido. A HR é iniciada pela ressecção das pontas do DNA no sítio da quebra para permitir a formação de uma extremidade 3'ssDNA (ssDNA- "*single-stranded DNA*"), que é capaz de invadir o duplex de DNA que contém a sequência homóloga. Estudos mostram que o complexo MRN, junto com a proteína CtlP, são necessários para as primeiras etapas de processamento da HR. O produto protéico do gene de susceptibilidade ao câncer de mama (BRCA1- "*Breast Cancer 1*") interage tanto com MRN quanto CtlP, possivelmente na ressecção da fita. A extremidade 3' gerada é então ligada à RPA, necessária ao subsequente recrutamento de RAD51, uma ATPase que forma filamentos nucleoprotéicos com o DNA. RAD51 é recrutada à região do dano por BRCA2 e estabiliza a troca das fitas enquanto a extremidade simples-fita invade o duplex de DNA homólogo. Mais comumente encontrado em células mitóticas, a HR se completa com a síntese de reparo, preenchimento da lacuna, e dissociação da nova fita sintetizada. Esta se pareia à sua respectiva fita, completando a reação (KASS; JASIN; PARDO; GOMEZ-GONZALEZ; AGUILERA, 2009) (**Figura 3**).

Figura 3. Esquema ilustrativo da via de reparo por recombinação homóloga (HRR- *Homologous Recombination Repair*). Após uma DSB, ATM é fosforilada e o complexo MRN é imediatamente recrutado para o sítio da lesão. As proteínas BRCA1, BRCA2 e Ctp se unem ao complexo, promovendo a ressecção da fita gerando a extremidade 3' coersiva. RPA se liga a esta e RAD51 estabiliza a fita. A partir de então, três processos são possíveis: No 1º, RAD51, além de estabilizar, permite a invasão das fitas nos duplex homólogos. Esta invasão gera a figura de *Holidays Junctions*, que são estabilizadas por BRCA2 e PALB2, quando a síntese de reparo é efetuada e as junções resolvidas por uma Ligase. No 2º, denominado *Single Strand Annealing* (SSA) dependente de síntese, apenas uma das fitas invade e é reparada com base no duplex homólogo. E no 3º, o SSA, um tipo de reparo sujeito a erros e que não requer polimerização, após a ressecção, as fitas são levadas a se anelar entre si em qualquer região que apresente uma pequena homologia, gerando duas extremidades *overhangs* que são eliminadas por uma enzima FLAP endonuclease e o duplex reconectados por uma Ligase.

O reparo do tipo NHEJ, por sua vez, repara as duplas-quebras por uma religação das duas extremidades. Parece ser a via de reparo de DSBs mais poderosa, pois tem o potencial de ligar qualquer tipo de terminação, sem a necessidade de haver uma homologia entre as sequências (ao contrário da HR). No entanto, é um reparo susceptível a erros, uma vez que pode causar pequenas inserções ou deleções (**Figura 4**) (LAMARCHE; ORAZIO; WEITZMAN, 2009; PARDO; GOMEZ-GONZALEZ; AGUILERA, 2009). Sete fatores foram identificados, em mamíferos, como sendo componentes críticos de NHEJ. As subunidades regulatórias que se ligam ao DNA, KU70 e KU80, junto com a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs- também da família PIKK) formam a holoenzima DNA-PK, e estão envolvidas no reconhecimento da lesão. DNA-PK ativada recruta outras proteínas, como Artemis (que resolve as extremidades de DNA), XRCC4, DNA Ligase IV e DNA polimerase, que completam o reparo (LIEBER, 2010; LIEBER et al., 2010).

Figura 4. Esquema representativo da via de NHEJ. 1 e 2. Indução de DSBs no DNA. 3. Reconhecimento da lesão por proteínas de ligação ao DNA (Ku70, Ku80 e DNA-PK). Auto-fosforilação de DNA-PK e/ou fosforilação por ATM/ATR, gerando DNA-PKcs, e fosforilação de outras proteínas importantes na estabilidade cromatínica e respostas ao dano, como γ H2AX e 53BP1. 4 e 5. Processamento das extremidades do DNA lesado e resolução da dupla-quebra.

A Anemia Fanconi (FA – “*Fanconi Anemia*”) foi pela primeira vez descrita em 1927 pelo pediatra Guido Fanconi, a partir da observação de um conjunto de manifestações em três irmãos que tinham entre 5 e 7 anos. As características observadas nessas crianças eram hiperpigmentação, malformações esqueléticas, baixa estatura, anomalias urogenitais, ocorrência

familiar e, marcadamente, uma falência progressiva da medula óssea, que imprimia um quadro semelhante ao de anemia perniciosa (LOBITZ; VELLEUER, 2006).

As observações do médico lançaram os critérios diagnósticos da nova doença, que foram utilizados por anos. Atualmente, sabe-se que outros sintomas acompanham esses pacientes: eles tendem a apresentar também telangiectasia, microcefalia, deformidades cardíacas e tendem a desenvolver tumores precocemente, sendo os mais comuns os linfomas, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, tumores de cérebro e leucemias mielóides (AUERBACH, 2009).

Assume-se que a susceptibilidade aumentada dos pacientes ao câncer é devido à uma instabilidade cromossômica espontânea, que pôde ser verificada nos linfócitos deles, quando colocados em cultura. Adicionalmente, as células desses pacientes são hipersensíveis aos agentes indutores de ligações cruzadas no DNA (ICLs- “*Interstrand Crosslinks*”), como a mitomicina C (MMC) e diepoxibutano (DEB) (AUERBACH; WOLMAN, 1976; KITAO; TAKATA, 2011; JOENJE; PATEL, 2001; SASAKI; TONOMURA, 1973). Por causa da grande variabilidade na incidência das características físicas dos pacientes, esta característica de hipersensibilidade a ICLs foi bastante utilizada como diagnóstico diferencial ou na identificação de casos pré-anêmicos, de pacientes com anemia aplásica ou leucemia. Hoje, os testes citogenéticos que quantificam as quebras cromossômicas induzidas por agentes indutores de ICLs são considerados como padrão ouro no diagnóstico de FA (AUERBACH, 2009; SOULIER, 2011).

FA é composta por 14 grupos de complementação conhecidos (FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N e P), além de um grupo semelhante a FA (FA-O). Sua incidência é bastante baixa na população, com uma frequência estimada de 1 a 5: 1.000.000 de pessoas. Os grupos FA-A, FA-C e FA-G são os mais comuns, correspondendo a 85% dos pacientes acometidos. FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F e FA-L perfazem 10% e os outros menos de 5%. Os genes envolvidos são denominados *FANC* e, com excessão de *FANCB* (que se localiza no cromossomo X), todos estão localizados em cromossomos somáticos, caracterizando a doença como autossômica recessiva ou ligada ao X (CROSSAN; PATEL, 2011; JOENJE; PATEL, 2001; KNOCH et al., 2012; SU; HUANG, 2011).

Seus produtos gênicos participam numa via de reparo comum- a via de FA- que resolve o reparo de ICLs encontrados durante a fase S. Entre os vários tipos de lesões aos quais o DNA está sujeito – adutos, quebras simples ou duplas e *mismatches* - os ICLs são o tipo mais tóxico, pois impedem a separação da dupla hélice do DNA devido às ligações covalentes irreversíveis entre as duas fitas. Afetam, por isso, funções cruciais do metabolismo do DNA (como a replicação e a transcrição) e exigem um tipo de reparo ainda mais elaborado- dado que se ambas as fitas do DNA são afetadas, elimina-se qualquer molde codificante (DEANS; WEST, 2011; HINZ, 2010).

A via funciona da seguinte forma: FANCM, que forma um heterodímero com FAAP24, tem atividade de translocase e previne o colapso da forquilha de replicação através de um remodelamento do DNA, independentemente da ativação da via. Porém, FANCM também é capaz de ativar a via, seja por uma interação direta com FANCF ou pelo reconhecimento da lesão no DNA e ligação à proteína HCLK2, que facilita a ativação do *checkpoint* de fase S por ATR-CHK1. ATR-CHK1, por sua vez, fosforilam outras proteínas FA, recrutando os fatores que formarão o complexo nuclear cerne, com atividade E3 ubiquitina ligase. O complexo se liga à cromatina e à matriz nuclear e é composto por oito proteínas: FANCA/B/C/E/F/G/L/M. Embora apenas FANCL tenha atividade E3 ubiquitina ligase, todas as proteínas do complexo são importantes e qualquer mutação nesses componentes acarretam na sua desestabilização e perda da atividade da E3 ligase (CROSSAN; PATEL, 2011; KIM; D'ANDREA, 2012; SU; HUANG, 2011).

A monoubiquitinação do heterodímero FANCI-FANCD2 pelo complexo é o principal evento da ativação da via. No entanto, evidências recentes têm apontado para o fato de que RAD18, uma E3 ligase responsável pela monoubiquitinação de PCNA em resposta ao bloqueio da replicação por danos no DNA, também contribui para a regulação de FANCD2. A monoubiquitinação de PCNA leva a uma troca das polimerases replicativas por polimerases capazes de promover o *bypass* da lesão. Ambos os eventos de monoubiquitinação de PCNA por RAD18 e o recrutamento de polimerases translesão são também necessários para a eficiente monoubiquitinação de FANCD2 (SU; HUANG, 2011; KIM; D'ANDREA, 2012; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013).

Esta modificação pós-translacional de FANCD2 é um pré requisito para a sua associação ao foci de reparo, conjuntamente com outras proteínas como FANCD1 (BRCA2), FANCF (BRIP1), FANCG (PALB2) e FANCI (RAD51C). Essas proteínas atraem, então, as moléculas efetoras do reparo propriamente dito da lesão. A proteína FAN1 (*Fanconi Associate Nuclease1*) e POLH colocalizam com FANCD2 nos foci nucleares. FANCP (SLX4) também é recrutada e age como uma plataforma para outras três nucleases- XPF-ERCC1, MUS81-EME1 e SLX1- que agem no sítio do dano realizando incisões em ambos os lados dos nucleotídeos comprometidos. Essas incisões desengancham o *cross-link*, convertendo a forquilha bloqueada em uma DSB. A síntese translesão em oposição ao aduto remanescente leva a uma restauração da fita nascente. O aduto é removido por NER e a DSB é reparada por DSBR (**Figura 5**) (BERGSTRALH; SEKELSKY, 2008; KIM; D'ANDREA, 2012; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013; SHUKLA et al., 2013).

Figura 5. Esquema representativo da via de FA. **1.** Diante de um ICL, a forquilha de replicação fica fisicamente impedida de continuar. Neste momento, Rad18-Rad6 promovem a monoubiquitinação de PCNA, resultando numa troca das polimerases replicativas por TLS Pols. **2.** O heterodímero FancM-FAAP24 é recrutado e evita o colapso da forquilha por um remodelamento da cromatina; FancM associa-se a FancF e/ou a HCLK2, ativando os outros componentes da via por uma transdução de sinal mediada por ATR/CHK1 e levando à formação do Complexo 1. O Complexo 1 é responsável pelo evento chave da via, que é a monoubiquitinação de FancI-FancD2. **3.** FancI-FancD2 associa-se ao complexo, recrutando as proteínas efetoras do reparo propriamente dito. O complexo SLX4 promove o corte envolvendo o ICL; **4.** Tanto o Complexo 1 quanto SLX4 deixam o sítio da lesão e apenas as proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade das fitas e recrutamento do reparo permanecem. TLS Pols são recrutadas para o *bypass*, NER é recrutado para remoção do aduto remanescente e o DSB, provavelmente HR, é recrutado para resolver a quebra. USP1 e UAF1 são responsáveis pela deubiquitinação de FancI-FancD2, regulando negativamente a via.

Sabe-se que HR e NHEJ são vias concorrentes no reparo de DSBs. A eliminação de componentes de NHEJ em células deficientes em FA é suficiente para suprimir a hipersensibilidade das células a ICLs e o acúmulo de aberrações cromossômicas. Isto sugere que a principal função das proteínas FA é evitar a ação promíscua de NHEJ durante o reparo do DNA, evitando o acoplamento aberrante desta maquinaria e facilitando o reparo dependente de recombinação (ADAMO et al., 2010; PACE et al., 2010). Assim, as DSBs gerados são reparadas por HR, com participação das proteínas relacionadas à Fanconi, BRCA2, BRIP1, PALB2 e RAD51C, esta última responsável pelos passos de invasão da fita e pareamento com a região homóloga durante a recombinação (DEAKYNE; MAZIN, 2011; HOLLOMAN, 2011; KIM; D'ANDREA, 2012; MCNEIL; MELTON, 2012).

Curiosamente, a perda de USP1 (*“Ubiquitin-Specific Peptidase 1”*) em murinos também resulta em um fenótipo similar ao de FA e tanto o *knockout* de USP1 e UAF1 em células de galinha DT40 imprimem hipersensibilidade a agentes indutores de *cross-link* (KIM et al., 2009; OESTERGAARD et al., 2007). Esses dados sugerem que a deubiquitinação de FANCD2 pela ação de USP1 em associação com UAF1 constitui outro passo crítico no reparo de ICLs, sendo importante para a realização do processo de reparo e tolerância (GUERVILLY et al., 2011; SU; HUANG, 2011).

- A síndrome conhecida como HNPCC (*“Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer”*), foi descrita pela primeira vez em 1913 pelo patologista Warthin. O médico percebeu a ocorrência de

cânceres colorretal (CRC- “*Colorectal Cancer*”), de estômago e útero em várias gerações de uma mesma família, que eram diagnosticados bem mais precocemente do que os casos esporádicos. A pesquisa de Warthin foi continuada por Henry Lynch, que em 1966 fez a diferenciação entre os casos de cânceres sítio-específicos (HNPCC ou Síndrome de Lynch 1) e os casos em que outros órgãos além do cólon eram também afetados (Lynch 2), tendo estabelecido que os casos se tratavam de uma herança autossômica dominante altamente penetrante. Esses estudos descritivos foram essenciais na descoberta, em 1993, da base genética de HNPCC (LYNCH; LYNCH, 1994; DOUGLAS et al., 2005).

Atualmente, estima-se que 2 a 4% de todos os casos de câncer colorretal sejam do tipo de Lynch1. A análise genômica de diversas famílias portadoras de CRC levou à descoberta de dois loci cromossômicos importantes: 2p e 3p. Foi observado também que nos casos hereditários, os tumores tinham características histopatológicas diferentes dos casos esporádicos. Além disso, a presença nesses tumores de instabilidade por microssatélites (MSI – “*Microsatellites Instability*”) forneceu evidências do envolvimento da via de reparo *Mismatch Repair* (MMR), numa correlação que já havia sido verificada na genética de bactérias e leveduras (BELLIZZI; FRANKEL, 2009; MARTIN-LOPEZ; FISHEL, 2013).

A via de MMR é uma via de reparo de DNA altamente conservada capaz de corrigir alças de inserção/deleção (IDLs- “*Insertion/Deletion Loops*”) de nucleotídeos e erros de pareamento de bases advindos, especialmente, de erros da replicação. Estima-se que de modo geral, MMR aumente a acurácia da replicação do DNA de 20 a 400 vezes. Dois tipos de mecanismos de MMR já foram elucidados: um, encontrado em eucariotos e na maioria das bactérias, e outro, específico de *E. coli* e bactérias relacionadas. A diferença entre eles está na forma de discriminar a fita de DNA que, contendo o mau pareamento, deve ser reparada. No primeiro grupo a discriminação se dá pelo reconhecimento de descontinuidades no DNA e no segundo, pela falta de metilação existente na fita recém sintetizada (BUERMEYER et al., 1999; FUKUI, 2010; LI, 2008).

Em eucariotos, descontinuidades nas fitas recém sintetizadas ocorrem nos terminais dos fragmentos de Okazaki, por exemplo. A reconstituição bioquímica do sistema com extratos humanos ou de *Drosophila melanogaster* permitiram classificar os passos básicos de MMR como sendo os de licenciamento, degradação e re-síntese (BUERMEYER et al., 1999; HSIEH, 2001; SCHOFIELD; HSIEH, 2003).

O licenciamento é iniciado pela ligação de um complexo heterodimérico homólogo a MutS- que pode ser MSH2-MH6, capaz de reconhecer erros de pareamentos e IDLs de 1 ou 2 nucleotídeos, ou MSH2-MSH3, que reconhece IDLs maiores que 2 nucleotídeos. Esses complexos de iniciação formam um gancho transiente que sonda o dúplex de DNA de forma rotativa, procurando por *mismatches*. A identificação de um mau-pareamento provoca a ligação de ATP, que induz uma mudança conformacional no gancho, tornando-o mais estável e capaz de

recrutar os outros componentes de MMR. Os homólogos de MutL são recrutados e colaboram na organização de outras proteínas no sítio da lesão. Os equivalentes de MutL em humanos existem em três formas heterodiméricas: MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-MLH3) e MutL γ (MLH1-PMS1), sendo que PMS2 e MLH3 são as subunidades que apresentam atividade endonucleásica (YUAN et al., 2012).

Com a ligação de MutL, os complexos MSH-MLH tornam-se então competentes para translocar pelo DNA *via* mecanismos de hidrólise de ATP. A translocação pelo DNA parece ser necessária para ativação das atividades endonucleásica, helicásica e exonucleásica. O complexo se desloca pelo DNA até encontrar PCNA ligado no *nick* de terminação 3' e induz quebras adicionais em ambos os lados do *mismatch*, na fita que contém o corte. A exonuclease EXO1 é carregada e gera uma longa lacuna simples-fita, que é preenchida pela ação de PCNA/Pol δ , concluindo as etapas de degradação e re-síntese. O *nick* remanescente é ligado pela DNA ligase 1 (BAERENFALLER; FISCHER; JIRICNY, 2006; GUPTA; GELLERT; YANG, 2011; KLECZKOWSKA et al., 2001; LU et al., 2006).

Algumas outras vias de reparo de DNA, embora não tenham nenhuma doença reconhecidamente associada a mutações em seus componentes, também são de fundamental importância na manutenção do genoma.

Uma dessas vias de reparo- que lida com lesões menores, que não distorcem fortemente a dupla-hélice do DNA- é de suma importância na integridade da informação genética, visto que diversas modificações desses tipos ocorrem no DNA com alta frequência. Por exemplo, mais de 100 tipos de modificações oxidativas de bases podem surgir potencialmente no DNA, como resultado do ataque de espécies ativas de oxigênio (ROS- “*Reactive Oxygen Species*”), em sua maioria geradas a partir da respiração mitocondrial (IYAMA; WILSON, 2013; SCOTT et al., 2014). Estima-se que entre 50.000 a 200.000 sítios AP (“Apurínicos ou Apirimidínicos”) surjam espontaneamente por célula (de mamífero) por dia (LINDAHL, 1993; NAKAMURA; SWENBERG, 1999), ou ainda que diversas bases sejam alquiladas, como resultado da reação com compostos provenientes da alimentação, medicamentos, cigarro ou do metabolismo normal do estômago e intestino (FAHRER; KAINA, 2013; IYAMA; WILSON, 2013; LINDAHL, 1993; NAKAMURA; SWENBERG, 1999; SCOTT et al., 2013).

O reparo por excisão de bases (BER), é a via de reparo que lida com esses tipos de lesões e foi descoberta há quase 35 anos atrás. Seu modelo de ação mais bem conhecido requer a função de apenas quatro proteínas: uma DNA glicosilase, uma AP endonuclease ou DNA AP liase, uma DNA polimerase e uma DNA ligase. O primeiro passo no reparo de BER é o reconhecimento da base danificada pela DNA glicosilase apropriada. Após este reconhecimento, a glicosilase catalisa a clivagem de uma ligação N-glicosídica, removendo efetivamente a base danificada e criando um

sítio apurínico ou apirimidínico (AP) A estrutura de DNA resultante pode ser, então, processada por duas subvias distintas: a via *long patch* ou *short patch*, que envolvem uma AP endonuclease ou uma DNA AP liase, respectivamente. A atividade da AP endonuclease (FEN1) gera um corte na região 5' do sítio AP (que compreende de 2 a 10 nucleotídeos), contrastando com o corte criado a 3' da atividade da AP liase (que compreende apenas um nucleotídeo). A DNA polimerase preenche a lacuna com o nucleotídeo correto e, finalmente, a DNA ligase completa o processo de reparo e restaura a integridade da hélice (PARKINSON; WHEELER; MCDONALD, 2008; ROBERTSON et al., 2009).

A enzima Poly(ADP-ribose)polimerase (PARP-1) tem um papel importante na via de reparo BER. É uma enzima que se liga ao DNA, ativada por simples quebras, que as converte em um sinal intracelular via ribosilação de proteínas nucleares. Polímeros negativamente carregados de ADP- ribose (PAR) ligados a PARP-1 e a histonas levam ao relaxamento da cromatina, facilitando o acesso das proteínas de reparo por excisão e de quebras no DNA, ativando-as. Acredita-se que inibidores de PARP-1 possam ser potentes moduladores da resistência à terapia e muitos deles já estão em desenvolvimento clínico (CIMMINO et al., 2007; PARKINSON; WHEELER; MCDONALD, 2008; RODON; INIESTA; PAPADOPOULOS, 2009; SARKARIA et al., 2008; ZAREMBA; CURTIN, 2007).

Por fim, ainda é importante ressaltar um mecanismo de reparo de DNA muito simples, porém muito importante, que age pela reversão direta do dano. Um exemplo de mecanismos deste tipo em humanos é o da enzima O6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase (MGMT). Esta enzima é capaz de reparar através de um único passo lesões pré-mutagênicas, pré-carcinogênicas e pré-tóxicas do tipo O6-alquilações e é especialmente importante pelo seu potencial envolvimento na resistência de tumores a quimioterápicos (KAINA et al., 2007).

O fenômeno se dá pela transferência direta do grupamento alquil do oxigênio do DNA para o resíduo de cisteína no núcleo catalítico da enzima, restaurando o DNA e inativando a si mesma. Como uma única molécula da enzima pode reparar apenas um grupamento alquil, a capacidade da célula em remover os adutos depende do número total de moléculas de MGMT por célula e da taxa de re-síntese da enzima. Adicionalmente, a taxa de transferência do grupo alquil é tanto maior quanto menor for o grupamento; assim, grupos metil são removidos mais rapidamente do que grupos etil e assim por diante. MGMT pode ser fosforilada, porém essa modificação translacional parece diminuir a eficiência da enzima. A enzima inativada é, então, ubiquitinada e degradada pelo proteasoma (CHRISTMANN et al., 2011; FAHRER; KAINA, 2013; KAINA et al., 2007; KAINA; MARGISON; CHRISTMANN, 2010).

1.2.4 Tolerância aos danos no DNA: suportar também é preciso

Enquanto as vias de reparo operam no sentido de corrigir os insultos sofridos pelo genoma, a via de tolerância aos danos age como um mecanismo que tem por fim tentar preservar a funcionalidade da célula e garantir a sua sobrevivência (ainda que ao custo da incorporação de erros ao código genético), uma vez que a duplicação de um genoma danificado incorre em um grande risco de colapso da foquilha de replicação e morte.

A síntese de DNA é realizada por DNA polimerases (pols) e diversas famílias delas já foram identificadas: A, B, C D, X, Y e RT (transcriptase reversa). As pols responsáveis pela replicação cromossômica e envolvidas nos processos de reparo pertencem às famílias A, B e X; São consideradas de alta fidelidade por sua capacidade de selecionar de forma eficiente o nucleotídeo correto na reação de polimerização de um DNA íntegro. Além disso, apresentam uma atividade exonucleásica associada, que atua na revisão dos nucleotídeos recém pareados, aumentando a sua eficiência (GILL; WANG; MILLAR, 2011).

No entanto, as pols replicativas (como por exemplo α , δ e ϵ da família B) não podem lidar com qualquer estrutura que escape o pareamento canônico de Watson e Crick. A razão para isso é explicada pela estrutura tridimensional dessas enzimas: o seu formato lembra uma mão direita fechada, com domínios denominados palma, dedo e polegar (LEMAN; NOGUCHI, 2013; PRINDLE; LOEB, 2012). Essas enzimas acoplam seus sítios ativos de forma bastante justa ao seu substrato (DNA), enquanto o domínio dedo colabora com a catálise do par de bases nascente (FLECK; SCHAR, 2004; TAHIROV, 2012). Quando, por exemplo, um nucleotídeo é erroneamente incorporado, essas pols respondem com uma distorção conformacional de seus sítios ativos, causando uma pausa na replicação e translocação do substrato para o centro catalítico exonucleásico, que retira o nucleotídeo da fita recém sintetizada. A síntese é, então, reiniciada (FLECK; SCHAR, 2004; JOHNSON, 2010; PAVLOV; SHCHERBAKOVA, 2010).

Por outro lado, as pols de síntese translesão (TLS – “*Translesion Synthesis*”) - a maior parte delas da família Y de pols- η , κ , ι e Rev1, além de pol ζ da família B- são consideradas de baixa fidelidade e caracterizadas, além dos domínios palma, dedo e polegar, por mais um domínio carboxi-terminal denominado dedo pequeno (SHOWALTER et al., 2006). Em contraste às pols replicativas, os domínios palma e dedo das TLS formam um sítio ativo frouxo, acomodando o DNA através de poucos contatos não específicos (FRIEDBERG, 1995; SHOWALTER et al., 2006). Esta geometria aberta do sítio ativo é o fator determinante que resulta na habilidade delas em tolerar as distorções do substrato dentro ou próximo do sítio ativo (SALE; LEHMANN; WOODGATE, 2012). Adicionalmente, as TLS pols não apresentam atividade revisora e compartilham um sítio de ligação à ubiquitina em sua estrutura. Este sítio é extremamente

importante, uma vez que ele aumenta a afinidade por PCNA ubiquitinado, elemento chave na regulação entre pols replicativas e TLS (FLECK; SCHAR, 2004; LEMAN; NOGUCHI, 2013).

Cada TLS pol tem um padrão específico de incorporação de nucleotídeos em oposição a lesões específicas, especialmente em eucariotos, e a escolha do nucleotídeo pode ser livre de erro ou, mais comumente, propensa a erros (*error prone*) (FRIEDBERG, 1995). Por causa disto, mutações em diferentes genes que codificam essas enzimas podem resultar em ausência de mutações, hipermutabilidade ou uma mudança no espectro de mutações. Assim, também podem levar à instabilidade genômica e câncer (DRABLOS et al., 2004; DUMAZ et al., 1993; HOFFMANN; CAZAUX, 2010; IKEHATA; ONO, 2011; SHACHAR et al., 2009).

Para um *bypass* bem sucedido, não apenas a inserção do nucleotídeo deve ser realizada, mas também a fita recém sintetizada deve ser suficientemente estendida para permitir a retomada da síntese por parte da pol de alta fidelidade, evitando o abortamento da TLS pela atividade revisora exonucleásica da pol replicativa. Porém, nem todas as enzimas TLS são capazes de atuar em ambos os eventos de inserção e alongação da fita e, por essa razão, é comum que duas TLS pols sejam requeridas para um evento de TLS completo (LIVNEH; ZIV; SHACHAR, 2010).

Baseado nisto, existem hoje quatro modelos de ação das TLS pols (**Figura 6**): No modelo mais simples, apenas uma TLS pol é necessária para o *bypass* frente a uma lesão específica. Este é o caso, por exemplo, de POLH frente a lesões induzidas por UV do tipo CPD (**Figura 6 A**). Outros modelos incorporam a combinação de diferentes TLS pols e dão origem aos modelos de “múltiplas TLS pol” (HARACSKA et al., 2000). O segundo modelo, então, sugere que uma pol é responsável pela inserção de um nucleotídeo e uma segunda pol seria responsável tanto por um segundo evento de inserção frente ao dano quanto pela alongação da fita. Este modelo foi especialmente estabelecido para descrever o *bypass* de POLI e POL ζ frente a outro tipo de lesões induzidas por UV, as do tipo 6-4PP (“6-4 Photoproducts”) (**Figura 6 B**) (DEIGHTON et al., 2010; LIVNEH; ZIV; SHACHAR, 2010).

Adicionando um maior grau de complexidade, os eventos de TLS poderiam ocorrer na forquilha de replicação ou como um evento posterior de preenchimento de uma lacuna deixada por esta (LEHMANN; FUCHS, 2006). Esses modelos, no entanto, são mais teóricos. Neste contexto, o terceiro modelo postula que quando a forquilha depara-se com uma lesão, deve haver ao menos dois eventos de troca de pols e a TLS pol atuaria estritamente no *bypass*. A troca de pols seria, portanto, entre as pols replicativas e a(s) pol(s) TLS (**Figura 6 C**). No quarto modelo, a pol replicativa, ao encontrar uma lesão se dissociaria e reassumiria a síntese mais adiante, deixando uma grande lacuna. Posteriormente, diferentes TLS pols seriam recrutadas para os eventos de inserção e extensão, preenchendo esta completamente (**Figura 6 D**) (DEIGHTON et al., 2010; HOFFMANN; CAZAUX, 2010; LIVNEH; ZIV; SHACHAR, 2010).

Figura 6. Modelos Representativos dos possíveis mecanismos de TLS. **A.** Modelo de uma única TLS Pol, capaz de atuar no bypass e extensão, sem dissociação da forquilha de replicação; **B.** Modelo colaborativo de duas TLS Pols, uma capaz de atuar no bypass e a outra na elongação da fita; **C.** Modelo de dissociação e trocas de polimerases para o bypass da lesão; **D.** Modelo de *gap-filling*.

POLH talvez seja a pol TLS mais proeminente em humanos, pois sua perda torna as células significativamente mais sensíveis à luz UV e os indivíduos acometidos mais susceptíveis ao câncer, sendo também classificados clinicamente como XP (XP-V, de variante, por não se tratar de uma mutação na via de NER) (CRUET-HENNEQUART et al., 2010; KANNOUCHE; STARY, 2003; MAGNALDO; SARASIN, 2004). A capacidade de POLH em fazer o *bypass* de CPDs é extraordinária, pois insere corretamente duas adeninas em oposição aos dímeros de pirimidina (TT) e ainda reconhece que a lesão foi ultrapassada, dissociando-se do DNA num mecanismo dependente da lesão (DEIGHTON et al., 2010). POLH também pode realizar o *bypass* de outros tipos de lesões, como lesões induzidas por oxidações (8-oxoguanina), benzo[a]pireno (BaP), acetilaminofluoreno (AAF) e adutos derivados de cisplatina e oxaliplatina. A participação dessa proteína na tolerância a esses agentes sugere que ela possa também estar envolvida na resistência de tumores (HARACSKA et al., 2000; SALEHAN; MORSE, 2013;

VAISMAN et al., 2000; ZHANG et al., 2000). Outro fato interessante quanto a esta enzima é a sua participação na via de HR (KAWAMOTO et al., 2005; MCILWRAITH et al., 2005).

Em 2011, descobrimos no interior de Goiás, no município de Faina, a maior comunidade XP-V do mundo. Essa comunidade tem suas atividades baseadas principalmente na agropecuária e abrange, atualmente, mais de 30 pacientes afetados. Essa alta ocorrência deve-se, especialmente, ao grande número de casamentos consanguíneos. Nosso laboratório participou do diagnóstico molecular destes pacientes e conta, hoje, com diversos projetos relacionados do qual participamos ativamente no estabelecimento das culturas celulares primárias derivadas das biópsias de alguns deles, além da coleta de outras amostras biológicas para outros tipos de investigação.

1.2.5 Vias apoptóticas: o benefício do fim

A apoptose é um processo fisiológico normal que mantém a homeostase celular; é um mecanismo de morte celular determinado geneticamente, dependente de energia e regulado por fatores celulares envolvidos na proliferação e diferenciação (RUSSO et al., 2006). Por outro lado, a ativação da via apoptótica tem sido um mecanismo central pelo qual as drogas citotóxicas e a radiação matam as células tumorais. Desta forma, a evasão da apoptose não só tem sido reconhecida como um dos fatores essenciais da alteração da fisiologia celular normal, determinando um crescimento maligno, como um mecanismo importante de resistência tumoral (FESIK, 2005; WILSON; JOHNSTON; LONGLEY, 2009).

A palavra grega *apoptosis* remete à caída programada das folhas das árvores no outono. Morfologicamente, em células humanas, envolve a compactação e segregação da cromatina nuclear e condensação do citoplasma. A membrana plasmática sofre um concolução, produzindo fragmentos de células (corpos apoptóticos). Esses fragmentos são circundados por membrana e contêm componentes nucleares. Bioquimicamente, a apoptose é caracterizada pela externalização da fosfatidilserina e pela clivagem das duas fitas de DNA nas regiões de conexão entre os nucleossomos, resultando na formação de múltiplos fragmentos com tamanho aproximado de 200 pb (COTTER, 2009; MACFARLANE, 2009; YAMAGUCHI et al., 2009).

A apoptose pode ser desencadeada por dois tipos de sinais: um sinal extrínseco, que responde principalmente aos estímulos extracelulares, e outro intrínseco, ativado por moduladores da própria célula. Embora a princípio essas duas vias estejam aparentemente separadas, ao final elas convergem para um ponto crucial, que é a conversão de procaspases em caspases; o evento bioquímico que mais influencia nas modificações estruturais da célula apoptótica (CHIPUK et al., 2003; RUSSO et al., 2006).

A via extrínseca da apoptose tem como componentes-chaves os receptores de morte. A superfamília dos receptores de morte de TNF (TNF-R – “*Tumor Necrosis Factor Receptor*”) é caracterizada por domínios extracelulares ricos em cisteína e por motivos intracelulares de interação, como os domínios de morte (DD – “*Death Domain*”) e o domínio de ligação TRAF (“*TNF- Receptor Associated Factor*”). Em geral, esses receptores são capazes de ativar as cascatas sinalizadoras que levam à ativação de fatores transcricionais ou à morte celular (ELROD; SUN, 2008).

A ativação desses receptores se dá pela sua ligação a moléculas específicas. Esses ligantes pertencem à família de TNF, uma citocina inflamatória liberada por uma variedade de tipos celulares, incluindo células imune-efetoras. Ligantes pró-apoptóticos relacionados a essa família incluem FAZ/APO1/CD95 (CD95L) e TRAIL (“*TNF-related apoptosis- inducing ligand*”) (REED, 2000).

As ligações de CD95L e TRAIL aos seus receptores cognatos induzem a sua ativação. Os DDs ligam-se a proteínas adaptadoras como FADD (“*Fas-associated death domain*”) ou TRADD (“*TNFR1-associated death domain protein*”) para formar um complexo sinalizador indutor de morte (DISC – “*Death-Inducing Signalling Complex*”), que recruta as pró-caspase 8 e 10. Estas são proteoliticamente ativadas e servem como caspases iniciadoras, ativando inúmeras proteínas reguladoras e estruturais, além de proteínas efetoras que estão à jusante, como as caspases 3 e 7, resultando no aparecimento dos marcos apoptóticos, como a fragmentação do DNA e a contração do núcleo (VAN HERREWEGHE et al.; VANGESTEL et al., 2009; MELLIER et al., 2010).

Dois tipos de sinalização intracelular são conhecidos para a via extrínseca: o tipo 1, independente da via intrínseca, e o tipo 2, dependente desta. No tipo 1, a estimulação da caspase 8 é suficiente para ativar as caspases efetoras, que por sua clivam substratos vitais da célula e induzem a morte. No tipo 2, a produção de DISC é insuficiente e uma amplificação do sinal é necessária; desta forma, a caspase 8 cliva a proteína BID (convertendo-a em tBID), que pode se ligar a BAX e BAK, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas que antes habitavam o seu interior (BURZ et al., 2009; KRAMMER, 2000; OZOREN; EL-DEIRY, 2002).

A via intrínseca da apoptose, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por uma ampla gama de sinais, que incluem radiação, drogas citotóxicas, estresse celular, hipóxia, retirada de fatores de crescimento, entre outros (JOO et al., 2008).

A família da proteína BCL-2 regula fortemente a ativação desta via. A proteína BCL-2 foi descoberta durante a análise molecular da translocação cromossomal t14-18 em células B de linfoma. Desde então, sua família cresceu para aproximadamente 20 membros. Todos eles

possuem pelo menos um domínio conservado dos quatro conhecidos - os motivos helicoidais conhecidos como BH (*"BCL-2 Homology"*).

Em relação à função, a família pode ser classificada em duas categorias: a de membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. As proteínas anti-apoptóticas possuem todos os 4 domínios BH (por exemplo, BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 e A1), enquanto as pró-apoptóticas podem ser ainda subdivididas em dois subgrupos: aquelas que apresentam apenas o BH-3 (BAD, BID, BIK/NBK, BIM, BMF, BIK, NOXA e PUMA) e as que apresentam multidomínios, BH1-3 (BAX, BAK e BOK) (CHIPUK et al., 2003; MACFARLANE, 2009; SZEGEZDI et al., 2009).

Essas proteínas estão localizadas na mitocôndria, retículo endoplasmático liso e na membrana perinuclear. Na mitocôndria, organela altamente especializada, existe uma membrana externa (OM – *"Outer membrane"*) separada da membrana interna (IM – do inglês *"inner membrane"*) por um espaço intermembranas (IMS – *"Intermembrane Space"*). Neste espaço encontram-se as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas da família BCL-2 e o balanço entre elas determina a sensibilidade a este processo de morte (BURZ et al., 2009; JOO et al., 2008).

O grupo de proteínas que contém apenas BH3 é considerado o primeiro elemento de resposta aos sinais de estresse ou do desenvolvimento. A ativação de BH3 durante o estresse pode ocorrer a nível transcricional (por uma indução de genes pró-apoptóticos, como PUMA e NOXA por TP53), por alterações pós-translacionais (como a fosforilação de BAD, BID/NBK), pela dissociação de proteínas sequestradoras, ou clivagem proteolítica (CHIPUK et al., 2003; FULDA, 2009; JOO et al., 2008).

Em resposta a um estímulo apoptótico, BAX e Bak homoligomerizam-se dentro dos poros de permeabilidade mitocondrial (MPP – *"Mitochondrial Permeability Pore"*), diminuindo o potencial de membrana mitocondrial, levando à formação de poros e facilitando a liberação do citocromo c do IMS para o citosol. A liberação do citocromo c estimula a formação do 'apoptosoma', composto pelo citocromo c/Apaf-1/procaspase 9, que causa a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, que enfim clivam substratos vitais, resultando na morte celular (BRECKENRIDGE et al., 2003; MELLIER et al., 2010; RUSSO et al., 2006; SZEGEZDI et al., 2009).

1.3 Glioblastoma Multiforme (GBM)

Os gliomas são o tipo mais comum de neoplasmas do sistema nervoso central (SNC) em adultos. A identificação e classificação da doença foi um processo longo e controverso, que só se desenvolveu à medida que as técnicas experimentais evoluíram e permitiram análises mais refinadas das características dos tipos tumorais. Assim, dependendo da época e da localidade, os

gliomas já foram denominados “sarcomas medulares” ou “fungus medulares”, entre outros (AGNIHOTRI et al., 2012).

O trabalho que lançou os fundamentos para a classificação moderna desses tipos tumorais foi elaborado por Bailey e Cushing (BAILEY; CUSHING, 1926), a partir da percepção de que pacientes com ressecção aparentemente total do tumor apresentavam tempos de sobrevida distintos. Assim, elaboraram uma classificação histológica baseada na correlação da história natural do tumor e o curso clínico, revolucionando a neuro-oncologia.

Atualmente, a classificação internacionalmente adotada é da organização mundial de saúde (WHO- “*World Health Organization*”) (LOUIS et al., 2007). O esquema classificatório se baseia em quatro critérios histo-morfológicos chaves: *i*- a presença de atipia nuclear; *ii*- de figuras mitóticas; *iii*- de proliferação microvascular e; *iv*- necrose. De modo geral, tumores de grau 4 são os denominados glioblastoma multiforme (GBM) e apresentam tipicamente três ou quatro desses elementos. Tumores de grau 3 (astrocitoma maligno ou anaplásico) apresentam duas dessas características e tumores de grau 2 (astrocitoma difuso), uma delas. Tumores de grau 1 são denominados astrocitomas pilocíticos e consistem de massas sólidas bem circunscritas, com figuras mitóticas raras ou ausentes, de crescimento vagaroso e com possibilidade de cura para o paciente mediante cirurgia.

Dentre os gliomas, o GBM é o mais frequente, perfazendo 53% deles e 17% entre todos os tumores cerebrais primários. É mais comum em adultos mais velhos e incomum em crianças. É 1,6 vezes mais frequente em homens e, quanto à etnia, tem frequência 2 vezes maior em brancos em relação aos negros. Porém, a relevância em se estudar esta doença provém de um dado ainda mais crítico: sua natureza extremamente agressiva leva os pacientes a uma sobrevida mediana entre 12 a 15 meses após o diagnóstico, apesar das múltiplas modalidades de tratamento. Ainda, apenas 3 a 5% dos pacientes alcançam uma sobrevida de 5 anos (CBTRUS, 2011; PORTER et al., 2010). Essas características elegem o tratamento de GBM como o menos bem sucedido entre os tumores sólidos. Embora metástases para fora do sistema nervoso central sejam incomuns, alguns casos podem ser encontrados na literatura (GUO et al., 2012; MENTRIKOSKI et al., 2008).

Nos tecidos tumorais de gliomas obtidos após ressecção cirúrgica, encontra-se não somente células tumorais, como também uma quantidade considerável de células não transformadas. Estas podem ser astrócitos, células endoteliais, linfócitos e, em sua maioria, macrófagos. Em relação a estes últimos, sua origem ainda é uma questão aberta. Macrófagos que residem normalmente no cérebro são denominados microglia. Alguns dados sugerem que as células da microglia encontram-se por todo o tecido cerebral normal e também de forma significativa dentro do tumor (BADIE; SCHARTNER, 2000). Outros estudos, no entanto, apontam para uma contribuição mais acentuada de macrófagos com fenótipo compatível aos

circulantes, advindos do infiltrado inflamatório, à composição do tecido tumoral (PARNEY, WALDRON, PARSA, 2009).

A contribuição destes tipos celulares na malignidade do tumor se dá devido ao fato de que a composição do microambiente tumoral pode influenciar o seu crescimento e limitar a eficiência da terapia (GRAEBER; SCHEITHAUER; KREUTZBERG, 2002; WATTERS; SCHATNER; BADIE, 2005). É bem conhecido, por exemplo, que macrófagos associados ao tumor (TAM- “*Tumor-Associated Macrophage*”) são capazes de promover diretamente o crescimento tumoral pela secreção de citocinas. Também podem participar na progressão tumoral, por sua influência nas células endoteliais, promovendo a neovascularização (LAMAGNA; AURRAND-LIONS; IMHOF, 2006; ZAMARRON; CHEN, 2011).

Surpreendentemente, embora os GBMs sejam tumores mais restritos (ao menos do ponto de vista anatômico) e consideravelmente isolados pela barreira hemato encefálica (BBB- “*Blood Brain Barrier*”), sabe-se que os pacientes são localmente e sistemicamente imunodeprimidos, com uma diminuição das respostas das células-T e aumento da circulação de células imunossupressoras do tipo T regulatórias (Treg) (DIX et al., 1999; FECCI et al., 2006). Diversos achados imunológicos apontam para a conclusão de que os macrófagos infiltrados nestes tumores assumem um fenótipo imunossupressivo que controla os outros agentes do sistema imune, através, por exemplo, da secreção de interleucinas imunossupressoras (BADIE et al., 2001; WAGNER et al., 1999). Porém, tem-se demonstrado que o contato direto entre as células tumorais de GBM e os TAM é necessário para uma completa indução desses efeitos imunossupressores (RODRIGUES et al., 2013), o que evidencia a capacidade da própria célula tumoral em governar o destino do tumor.

1.3.1 Origem e características das células tumorais

Ainda não se tem evidências claras da célula tumoral de origem em gliomas. Por muito tempo, acreditou-se que as células que dariam origem aos gliomas fossem os próprios tipos celulares maduros, característicos de cada grau: assim, células ependimais dariam origem a ependimomas, oligodendrócitos a oligodendromas e astrócitos a astrocitomas.

Esse conceito estava de acordo com o modelo de iniciação tumoral vigente, em que se propunha que o câncer era uma doença genética, iniciada por uma única célula na qual uma mutação poderia conferir-lhe uma vantagem seletiva. Essa célula se dividiria sob a influência de fatores proliferativos, formando uma população com as mesmas características (expansão clonal). A progressão tumoral decorrente seria resultado do acúmulo de mutações subsequentes, levando a diferenças entre os clones (MITRUS et al., 2012).

Este modelo parecia especialmente plausível no caso de tumores cerebrais, devido à grande massa de células diferenciadas e altamente especializadas do órgão e ao desconhecimento da existência, nele, de outros tipos celulares com capacidade de auto-renovação, como as células tronco multi-potentes.

Atualmente, no entanto, o modelo emergente sugere que células cancerígenas com características genéticas similares podem ser categorizadas hierarquicamente de acordo com o seu potencial tumorigênico. Neste modelo, um sub-grupo de células seria responsável pela iniciação e manutenção do tumor: as células tronco-tumorais (CSC- “*Cancer Stem Cell*”), que ficariam, por isso, no ápice da hierarquia. Células comprometidas com a diferenciação ou diferenciadas ocupariam posições mais baixas (BACCELLI; TRUMPP, 2012; LA PORTA, 2012; VISVADER; LINDEMAN, 2012).

Especula-se que a origem das CSCs seja células tronco neurais (NSC- “*Neural Stem Cell*”) que sofreram algum evento oncogênico, embora nenhuma evidência direta tenha sido relatada. Outra hipótese inclui a reprogramação ou dediferenciação de células maduras ou precursoras, que poderiam adquirir um fenótipo CSC (MARJANOVIC; WEINBERG; CHAFFER, 2013). Assim, de acordo com os modelos atuais de iniciação tumoral, a célula tumoral de origem (TIC- “*Tumor Initiating Cell*”) poderia ser, ou não, as CSCs (**Figura 7**) (SAMPETREAN; SAYA, 2013). Eu, particularmente, suspeito que ambas hipóteses sejam plausíveis e que a diferença na frequência entre TICs de origem tronco-tumoral ou de células diferenciadas possa se dar pelo número de eventos oncogênicos necessários para transformação de cada tipo celular.

Figura 7. Modelos de transformação maligna, em GBMs. **A.** Evento oncogênico numa Célula Tronco Neural, gerando uma Célula Tumoral de origem, com capacidade autoreplicativa e potencial oncogênico. **B.** Evento oncogênico numa Célula Tronco da Glia, gerando uma Célula Tumoral Progenitora, com capacidade autoreplicativa e potencial oncogênico. **C.** Evento oncogênico em células diferenciadas (astrócitos), conferindo-lhes capacidade autoreplicativa e potencial oncogênico.

As CSCs foram primeiramente identificadas em leucemias. Em GBMs, foram identificadas como neurosféricas que compartilham as características de células tronco (denominadas GSCs - “*Glioma Stem Cells*”), como a capacidade de auto-renovação e também a capacidade de diferenciar-se em todas as linhagens neurais (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos). Porém, diferentemente das células tronco normais, são capazes de induzir a formação de tumor *in vivo* (GALLI et al., 2004; RIETZE; REYNOLDS, 2006; SINGH et al., 2003; YUAN et al., 2004).

A diferenciação entre CSCs e as outras células tumorais ainda é alvo de estudos e atualmente se dá através de marcadores celulares de superfície ou intracelulares. O marcador mais clássico é o CD133, um marcador de NSC. Enquanto a população CD133- representa a grande massa de células tumorais, as células CD133+ podem compor de 10 a 25% dos GBMs, são capazes de formar neurosféricas, têm alta capacidade proliferativa (ainda maior que NSCs), são capazes de diferenciação e de induzir tumor *in vivo* (CHOY et al., 2012; SINGH; DIRKS, 2007; SINGH et al., 2003; YIN et al., 1997). Um fato que evidencia o potencial tumorigênico dessas células é o de que, enquanto para indução de tumor em camundongos imunodeprimidos são necessárias aproximadamente 10^6 células tumorais, o mesmo resultado é obtido com apenas 100 células da fração CD133+ (SINGH et al., 2004).

Outros marcadores de superfície empregados para esta diferenciação incluem SSEA-1 (“*Stage-Specific Embryonic Antigen 1*”) (SON et al., 2009), Integrin $\alpha 6$ (LATHIA et al., 2010), CXCR4 (FRICKER et al., 2006) e a molécula de adesão celular L1CAM (MANESS; SCHACHNER, 2007; BAO et al., 2008). Já entre os marcadores intracelulares, os principais utilizados são o NESTIN, uma proteína de filamentos intermediários envolvida na organização do citoesqueleto e implicado em sinalização celular, organogênese e metabolismo celular (ZHANG et al., 2008), e o SOX-2, um fator de transcrição que em conjunto com OCT3/4 e NANOG, é considerado um gene mestre na regulação da embriogênese em mamíferos e parte de uma complexa rede de fatores de transcrição que afeta tanto a pluripotência quanto a diferenciação em células tronco (GANGEMI et al., 2009; KNIGHTS; KYLE; ISMAIL, 2012).

É importante ressaltar, porém, que várias evidências apontam para o fato de que a contribuição de todos os tipos celulares do tumor não deve ser subestimada: por exemplo, diversos grupos demonstraram que células CD133- também são capazes de iniciar e manter o tumor *in vivo* (WANG et al., 2008). Outro fato relevante é o de que diversos espécimes de GBM não apresentam qualquer célula CD133+. Adicionalmente, linhagens tumorais estabelecidas de GBM que não apresentam este marcador também são capazes de formar tumor *in vivo* (BEIER et al., 2007). Ainda mais intrigante, é o fato de que o tumor formado a partir células CD133- podem

mostrar-se com características de maior capacidade proliferativa e angiogênica quando comparados a CD133+ (JOO et al., 2008; XIE, 2009).

Tradicionalmente, o marcador de linhagem tumoral mais comumente usado é o GFAP, um componente dos filamentos da glia, específico de astrocitócitos, que se acumula com o desenvolvimento tumoral. Por isso é inclusive considerado fundamental para o diagnóstico de GBM (CHUMBALKAR et al., 2005; DEIGHTON et al., 2010).

1.3.2 GBMs primários, secundários e vias genéticas envolvidas

Os GBMs podem ser classificados em dois subtipos: um, capaz de apresentar-se prontamente como um tumor de grau IV, sem qualquer evidência clínica ou histológica de uma lesão precursora pré-existente ou de menor grau de malignidade (estes são denominados GBMs primários ou *de novo*); – outro subtipo, que se desenvolve mais lentamente a partir da progressão de um astrocitoma de menor grau, usualmente de graus II ou III (denominados GBMs secundários) (BENJAMIN; CAPPARELLA; BROWN, 2003; KLEIHUES; OHGAKI, 1999; SCHERER, 1940).

Embora histologicamente seja impossível distinguir ambos os tipos, várias outras características possibilitam a separação entre eles. Quanto à ocorrência, GBMs primários são os mais frequentes, perfazendo 90% dos casos. O tempo médio relativo ao histórico clínico antes do diagnóstico também não é o mesmo: enquanto para os tumores primários é de apenas 3 meses, o tempo médio de progressão de um tumor secundário é de 5,3 e 1,4 anos, se progredindo a partir de gliomas graus II e III, respectivamente. GBMs primários e secundários localizam-se preferencialmente em áreas distintas do cérebro, afetam pacientes com médias de idade diversas (62 e 45 anos, respectivamente), apresentam distribuições de frequência distintas quanto ao gênero do paciente (tumores primários afetam preferencialmente homens e secundários, as mulheres) e, mais importante, apresentam uma evolução clínica diferente (OHGAKI et al., 2004; OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

O estudo dos subtipos de GBMs, através de análises genômicas, proteômicas e epigenéticas, têm contribuído para o entendimento da participação de diferentes mutações e vias metabólicas no curso da doença. Os principais produtos gênicos envolvidos são:

i) IDH1: Talvez a mutação no gene *IDH* (isocitrato desidrogenase 1) esteja entre as mais significativas na distinção entre GBMs primários e secundários. Este gene codifica para a enzima isocitrato desidrogenase 1, que cataliza a reação de carboxilação oxidativa do isocitrato a α -cetoglutarato, resultando na formação de NADPH no ciclo do ácido cítrico. As mutações em

IDH1 levam à produção de um (possível) oncometabólito - o 2-hidroxiglutarato - no lugar da coenzima (COHEN; HOLMEN; COLMAN, 2013). São bastante frequentes (>80%) em astrocitomas de baixo grau, astrocitomas anaplásicos, oligodendromas, oligodendrogliomas anaplásicos, oligoastrocitomas, oligoastrocitomas anaplásicos e GBMs secundários. Porém, bastante raras (<5%) em astrocitomas pilocíticos e GBMs primários e ausentes em ependimomas e outros tumores do SNC (BALSS et al., 2008).

ii) TP53: Outro gene diferencialmente mutado em GBMs é o *TP53*. Como anteriormente exposto, *TP53* é reconhecidamente um importante gene supressor de tumor envolvido nos principais mecanismos de defesa da célula contra agentes genotóxicos. Exerce sua função de supressão tumoral basicamente pela regulação transcricional de outros genes alvo. *TP53* encontra-se mutada em aproximadamente 50% dos cânceres humanos (VOGELSTEIN; SUR; PRIVES, 2010). No entanto, a incidência dessa mutação não é a mesma entre GBMs. Enquanto GBMs secundários apresentam uma frequência de mutação neste gene acima de 65%, em tumores *de novo* ocorrem em aproximadamente 25% dos casos (BENJAMIN; CAPPARELLA; BROWN, 2003; ENGLAND; HUANG; KARSY, 2013).

iii) Dados do valor preditivo de mutações em *TP53* em GBMs ainda não são totalmente conclusivos: alguns estudos sugerem que os casos de pacientes que carregam a mutação têm um prognóstico mais favorável. Porém, em um estudo populacional recente, verificou-se que TP53 só teria valor diagnóstico quando incorporado em modelos de análises univariadas. Quando incorporados em modelos de análises multivariadas ajustadas para idade, nenhuma diferença na sobrevivência foi detectada (OHGAKI et al., 2004; ENGLAND; HUANG; KARSY, 2013). Os modelos multivariados com ajustes tendem a ser mais confiáveis, pois não eliminam o efeito de interação que pode existir entre as variáveis de estudo e ainda possibilitam eliminar, em certo grau, efeitos de auto-correlação.

Outras mutações, por estarem na mesma via de TP53, podem comprometer sua função: recapitulando brevemente, MDM2 é uma proteína que se liga a TP53, inibindo-o, e TP53 pode induzir a sua transcrição, num mecanismo auto-regulatório. Além de MDM2, o produto do gene p14^{ARF} é capaz de ligar-se a MDM2, inibindo a degradação de TP53 mediada por MDM2 (HU; FENG; LEVINE, 2012). A super-expressão de MDM2 foi observada imunohistoquimicamente em aproximadamente 50% dos casos de GBMs primários que não carregam mutação em *TP53*. Por outro lado, menos de 10% dos tumores secundários apresentam essa super-expressão. Assim, a super-expressão de MDM2, na presença ou não de amplificação do seu gene, é uma marca de GBMs primários que tipicamente não apresentam mutações em *TP53* (BIERNAT et al., 1997; REIFENBERGER et al., 1993).

Já a metilação do promotor de P14^{ARF} é frequente em GBMs secundários, ocorrendo em um terço dos astrocitomas de baixo grau. A perda da expressão de p14^{ARF}, seja por deleção homozigótica ou pela metilação do promotor, ocorre em 50% dos casos de GBMs *de novo*. Na análise conjunta de todos esses dados, tem-se que pelo menos uma mutação na via de TP53/MDM2/P14^{ARF} é observada em 50% dos casos de GBMs primários e em mais de 70% dos casos de GBMs secundários (GALLI et al., 2004; OHGAKI, 2005; OHGAKI; KLEIHUES, 2007; 2009; AGNIHOTRI et al., 2012).

iv) **PI3K:** Enquanto os tumores secundários apresentam especialmente mutações na via de TP53, os tumores primários tendem a ter uma frequência maior na via de RTK/PTEN/PI3K. A cascata de sinalização desta via funciona da seguinte forma: um receptor transmembrana RTK (*“Receptor Tyrosine Kinases”*), como PDGFR, EGFR ou IGFR, após a ligação com fatores de crescimento, sofre uma autofosforilação do domínio intracelular, expondo os resíduos de fosfotirosina. Este fato permite a ligação de PI3-Kinase (*“Phosphatidylinositol 3-Kinase”*). Esta ligação ativa PI3K, responsável pela fosforilação de PIP2 (*“Phosphatidylinositol (4,5) bifosfato”*) em PIP3 (*“phosphatidylinositol (3,4,5) trifosfato”*). A presença de PIP3 na membrana plasmática recruta AKT, que é fosforilada por outras quinases residentes, como PDK1 (*“Pyruvate Dehydrogenase Kinase1”*). AKT, então, é capaz de fosforilar diversos alvos à jusante, envolvidos no controle do metabolismo, biogênese de ribossomos, sobrevivência, motilidade e mudanças morfológicas. A resultante mais clássica da via é ativação de mTOR (*“mammalian Target Of Rapamycin”*), que induz um aumento da síntese protéica de mRNAs envolvidos no aumento da proliferação (ABOUNADER, 2009; GEORGESCU, 2010; HAFSI et al., 2012; MCDOWELL; RIGGINS; GALLIA, 2011).

Mutações em quaisquer componentes desta via levam à sua ativação constitutiva. PTEN (*“Phosphatase and Tensin homologue”*) é o principal inibidor dela e atua desfosforilando PIP3 a PIP2. Diferentemente de outras proteínas, PTEN é inativado por fosforilação. O gene que codifica PTEN é um supressor tumoral virtualmente exclusivo, já que sua perda ou mutações não podem ser compensadas por nenhuma outra enzima conhecida (BOOSANI; AGRAWAL, 2013; MING; HE, 2012; SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

Em GBMs, a super-expressão de EGFR (*“Epidermal Growth Factor Receptor”*) é mais comum em tumores primários (>60%) e 70 a 90% desses casos se dão devido à amplificação do gene. Em tumores secundários, a super-expressão deste receptor ocorre em menos de 10% dos casos. Em contrapartida, a perda de heterozigidade (LOH – *“Loss Of Heterozygosity”*) do cromossomo 10 (LOH10) é a mutação mais frequentemente encontrada em GBMs e ocorre com a mesma frequência em ambos os subtipos (KANU et al., 2009). Porém, os tumores primários exibem LOH de todos os marcadores informativos, sugerindo uma perda de todo o cromossomo

10, enquanto os tumores secundários apresentam uma perda total ou parcial de 10q, mas não de 10p (FUJISAWA et al., 2000). PTEN localiza-se no 10q23 e esta mutação é observada em 15 a 40% dos casos de GBMs *de novo*. Ainda, a frequência combinada de mutações de qualquer subunidade de PI3K chega 17% nestes tumores (não há informação disponível sobre esta taxa em GBMs secundários) (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; OHGAKI, 2005; OHGAKI; KLEIHUES, 2007; TCGA; 2008; OHGAKI; KLEIHUES, 2009).

Devido à grande heterogeneidade de GBMs, que carregam muitas outras mutações além dessas descritas e que envolvem diversas outras vias, estudos recentes têm proposto a reclassificação dos GBMs baseado em achados moleculares. O principal deles, que compreendeu a análise de 200 amostras de GBMs e 2 de cérebros normais, utilizou-se de uma análise fatorial não supervisionada (um método robusto capaz de reduzir a dimensão dos dados) para agrupar as assinaturas moleculares. Foi sugerido, assim, a divisão em 4 subgrupos: clássico, mesenquimal, proneural e neural, sendo que as mutações gênicas que definem cada grupo estão em EGFR, NF1, PDGFRA/IDH1 e ERBB2, respectivamente (**Figura 8**) (VERHAAK et al., 2010).

Figura 8. Esquema ilustrativo do desenvolvimento diferencial de GBMs Primários e Secundários. Tempo, Mutações e vias genéticas envolvidas, além dos subtipos moleculares recentemente propostos.

No entanto, outros estudos são necessários para se confirmar a consistência desta classificação, devido, entre outros motivos, às próprias limitações do método de análise. Isso porque nas análises fatoriais hierárquicas assume-se independência entre os fatores, o que claramente não se aplica ao caso, dado que várias mutações que ocorrem no processo da carcinogênese são correlacionadas entre si e, ainda, podem correlacionar-se com outros fatores, como por exemplo a idade. De fato, a associação clínica mais consistente entre os subtipos tumorais propostos foi com a idade (Quanto maior a idade, maior a chance do desenvolvimento de GBMs primários).

1.4 Estratégias Terapêuticas

Embora o conhecimento sobre GBMs tenha se multiplicado nos últimos anos, isto ainda não foi revertido em tratamentos efetivos que alcançam a cura dos pacientes. Além do curto período de sobrevida, a própria evolução da doença é sombria (COLEN; ALLCUT, 2012).

Os protocolos atuais para o tratamento da doença incluem cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (JOHNSON; CHANG, 2012). Existem evidências que apontam para o fato de que quanto maior a ressecção do tumor, maior a sobrevida dos pacientes (MCGIRT et al., 2009). O objetivo da cirurgia no tratamento de GBM é, por isso, promover a máxima retirada do tumor (MCGIRT et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2009). Na prática clínica, no entanto, os cirurgiões são confrontados com situações mais delicadas, quando por exemplo o tumor invade regiões inoperáveis ou do córtex cerebral. Neste caso, alguns autores sugerem uma ampla discussão com os pacientes durante o período pré-operatório, sobre as consequências e limitações da cirurgia, visto que com frequência estes optam por uma preservação de certas funções (como movimento e fala), mesmo ao custo de uma remoção parcial do tumor (COLEN; ALLCUT, 2012).

Alguns avanços nas técnicas cirúrgicas podem contribuir para a segurança e eficiência na retirada do tumor, como o mapeamento do córtex, cirurgia esterotáctica, uso de ressonância magnética por imagem intraoperativa ou, ainda, a ressecção do tumor guiada por fluorescência (ANTON; BAEHRING; MAYER, 2012). Neste último caso, a fluorescência é obtida através da administração oral de um composto que contém 5-ALA (ácido aminolevulínico) e acumula-se preferencialmente nas células tumorais; sob a luz azul/violeta, este fluorófilo emite luz na região do vermelho do espectro visível, indicando a separação entre o tecido tumoral e normal (ROBERTS et al., 2012).

A maior parte das manifestações clínicas dos pacientes, como dores de cabeça progressivas, tonturas, convulsões, pressão intracranial aumentada, problemas focais por déficit

neurológico e alterações no status mental, tendem a melhorar apenas com a cirurgia (COLEN; ALLCUT, 2012; ZHANG et al., 2012).

A radioterapia tem sido há muito tempo utilizada como tratamento adjuvante clássico de GBMs. Nos tumores não operáveis, é a principal modalidade de terapia. Em 1979, estabeleceu-se a dose padrão de irradiação para pacientes de GBMs, através da demonstração de que pacientes que recebiam 60 Gy de radiação γ tinham um aumento significativo na sobrevida em comparação aos que recebiam doses menores. Desde então, diversos estudos têm mostrado que 60 Gy é mais eficaz que doses mais baixas e que doses mais altas tendem a ser tóxicas (ANTON; BAEHRING; MAYER, 2012; CHAN et al., 2010; THOMAS; RECHT; NAGPAL, 2013; WALKER; STRIKE; SHELINE, 1979).

A radioterapia é administrada por 6 semanas. Quanto à quimioterapia, as drogas quimioterápicas de escolha em geral pertencem a classe dos agentes alquilantes (AA), por sua citotoxicidade e capacidade de penetrar a BBB. São usualmente administradas concomitantemente com a RT e, após o encerramento desta, por outros 6 meses em ciclos de 5 por 28 dias (ZHANG et al., 2012). As nitrosouréias ACNU (nimustina), BCNU (carmustina) e CCNU (lomustina) são conhecidas como CENUs e foram, durante um longo tempo, as drogas comumente usadas como primeira linha no tratamento de GBMs (WELLER et al., 2012). Atualmente, a droga de escolha é a temozolomida (TMZ) (CHEN et al., 2012; CHEN; XU, 2013; STUPP; VAN DEN BENT; HEGI, 2005; THOMAS; RECHT; NAGPAL, 2013). (Por serem as principais drogas utilizadas na clínica e pelo tipo de lesão que induzem no DNA, ACNU e TMZ foram eleitas as drogas de estudo deste trabalho e serão melhor discutidas posteriormente).

Devido à baixa expectativa de vida dos pacientes, existe uma recomendação de que os médicos ofereçam a eles a oportunidade de participarem de estudos clínicos (MRUGALA, 2013). O número e tipos de estudos clínicos em andamento são enormes e abrangem, virtualmente, todos os aspectos das funcionalidades do tumor: sobrevivência, proliferação, apoptose, invasão, angiogênese, etc. Assim, algumas estratégias que visam aumentar a eficiência da terapia incluem o uso de agentes únicos que têm como alvos diferentes quinases (ZD6474), combinações de agentes que inibem alvos complementares, como EGFR e mTOR (erlotinib + temsirolimus), ou ainda inibidores protéicos em combinação à radio-quimioterapia (RT + TMZ + SAHA) (AGNIHOTRI et al., 2012).

Recentemente, a droga bevacizumab (um anticorpo monoclonal que inibe VEGF) tem sido o foco de diversos estudos clínicos em gliomas de alto grau. Já foi aprovada para o tratamento de cânceres metastáticos de mama, ovário, rins, pulmão e intestino. A administração desta droga juntamente com TMZ e RT em pacientes com GBM melhorou tanto a sobrevida quanto o tempo de remissão da doença quando comparado à TMZ e RT apenas. Por isso tem

sido indicada para incorporar o quadro de drogas utilizadas no tratamento desta doença (CHAMBERLAIN, 2010; CHEN E XU, 2013; NARAYANA et al., 2012; NARITA, 2013).

Além da busca por novas moléculas para o tratamento de GBMs, os cientistas também preocupam-se em buscar novas estratégias de administração para esses quimioterápicos, que contornem a baixa penetração que tem no CNS. Com o objetivo de fazer uma entrega local, com efeitos colaterais mínimos, diferentes abordagens têm sido atualmente empregadas, como a administração de moléculas terapêuticas via catéteres implantados intracranialmente, *convection-enhanced drug delivery* (CED), ou polímeros de liberação controlada da droga (BOTA et al., 2007; SUGIYAMA et al., 2007).

1.4.1 Agentes alquilantes

Os AA são um grupo de várias substâncias químicas que há um longo tempo são conhecidos por seus efeitos biológicos nos organismos vivos (BRONSTEIN et al., 1991). Compostos com capacidade de promover alquilações podem ser produzidos em processos endógenos do metabolismo normal ou encontrados no ar, na água, em alimentos, etc. Adicionalmente, também podem ser usados como drogas citostáticas na terapia contra o câncer (DRABLOS et al., 2004).

A alquilação nada mais é do que uma substituição nucleofílica na qual um hidrogênio do grupo nucleofílico (grupo de saída) é substituído pelo grupamento R da alquilação (grupo de entrada). A característica citotóxica desses agentes é derivada de sua habilidade em reagir com o DNA. Potencialmente, todos os grupos de bases que constituem o DNA, bem como o oxigênio das ligações fosfodiéster, podem ser alvos. Porém, alguns locais são mais favoráveis à reação: o local mais vulnerável é a posição N7 da guanina, correspondendo a 60-80% dos adutos. Outros sítios também podem ser afetados, como as posições O6 e N1 da guanina, N3, N7 e N6 da adenina, N2 e N4 da citosina e O2 e O4 da timina. Entre todas as lesões, a lesão O6-alkG é considerada a mais citotóxica, enquanto as outras são potencialmente mais mutagênicas (POURQUIER, 2011).

Os AA podem ser divididos em dois grupos: o primeiro deles, dos alquilantes monofuncionais, possui apenas um grupo reativo capaz de estabelecer adutos com a molécula alvo. Este grupo pode ser representado pelos triazenos monofuncionais, como as drogas quimioterápicas TMZ e Dacarbazina, que produzem O6-metilguanina (O6-meG) como lesão primária que leva à morte celular. O segundo grupo, dos agentes alquilantes bifuncionais, apresentam dois grupos reativos e por isso são capazes de estabelecer ligações entre duas moléculas de DNA ou entre o DNA e proteínas. Esse grupo é composto pelas nitrosoureas bifuncionais, que produzem O6- cloroetilguaninas (O6-cletG) no DNA e é representada pelos

CENUs- ACNU, BCNU e CCNU (JEFFREY, 1985; KAINA; MARGISON; CHRISTMANN, 2010; SANADA et al., 2007).

Os regimes terapêuticos baseados em nitrosoureas eram considerados, até recentemente, os mais efetivos para pacientes com glioma. Um estudo da “*Neurooncology Working Group* da *German Cancer Society*” reportou dados de sobrevivência mediana superior a 15 meses após o tratamento primário de radio-quimioterapia com ACNU. Uma meta-análise recente também propõe um ganho significativo no tempo de vida de pacientes recém diagnosticados com gliomas de alto grau tratados com a mesma droga (HAPPOLD et al., 2009).

Embora as drogas ACNU, BCNU e CCNU tenham mecanismos de ação muito semelhantes, a primeira tem se mostrado mais seletiva que as demais em eliminar células deficientes em MGMT, que ocorrem com frequência em gliomas (WOLFF et al., 2008). Alguns efeitos colaterais, porém, são os mesmos para todas elas: fadiga, náusea, mielossupressão, disfunção hepática e fibrose pulmonar relacionada à dose (KREISL, 2009). Essas características de toxicidade sistêmica das nitrosoureas têm feito com que TMZ seja recomendado como a droga de primeira escolha no tratamento de GBMs (REISMAN et al 2012.).

A recomendação do uso de TMZ pelas agências “*European Organization for Research and Treatment of Cancer*” (EORTC) e a “*National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*” (NCIC) se deu em 2005, após uma triagem clínica de fase 3 que demonstrou que o regime de RT + TMZ era capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes em até 15 meses. Adicionalmente, a qualidade de vida dos pacientes tratados com TMZ era considerada melhor em relação aos tratados com nitrosoureas, devido à melhor tolerabilidade da droga. Os efeitos colaterais de TMZ incluem mielossupressão (reversível), trombocitopenia e linfocitopenia (especialmente de linfócitos CD4+) (MUTTER; STUPP, 2006; SENGUPTA et al., 2012; STUPP, VAN DEN BENT; HEGI, 2005).

A droga TMZ (“*3,4-dihydro-3-methyl-4-oxoimidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-8-carboxamide*”), que foi sintetizada na década de 90, é uma prodroga derivada de imidazotetrazona que se decompõe espontaneamente a “*5-(3-metiltriazeno-1-imidazol-4-carboxamide*” (MTIC). MTIC, acredita-se, é o responsável pelo efeito tóxico da droga, pela formação do íon metildiazonium, que leva à formação de O6-meG no DNA (um metabólito inativo também é formado) (**Figura 9**). TMZ é um composto lipofílico, capaz de atravessar a BBB e que pode ser administrado *via* oral (PATEL et al., 2003; REYDERMAN et al., 2004; NAGASAWA et al., 2012).

Já a droga ACNU (“*3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride*”) foi primeiramente descoberta em 1974. Sob o ponto de vista químico, a sua molécula dissolve-se facilmente em água como um íon catiônico. Seu log *p* (coeficiente de partição octanol/água) é 0,92, o que significa que é tanto lipofílico quanto hidrofílico, porque é capaz de mudar de um íon catiônico a um composto neutro, em condições fisiológicas. Este fato é o que permite o seu trânsito pela BBB (SUGIYAMA et al., 2007). A lesão O6-cletG induzida

por ACNU é uma lesão instável que sofre espontaneamente um rearranjo intramolecular, formando N1-O6-etanoG e, subsequentemente, um ICL (N1-guanina-N3-citosina) (**Figura 9**) (GOMBAR; TONG; LUDLUM, 1980; TONG; KIRK; LUDLUM, 1981; 1982).

Tanto as lesões induzidas por TMZ (O6-meG) quanto por ACNU (O6-clctG) podem ser rapidamente reparadas pela enzima MGMT (**Figura 9**) e, por isso, o conhecimento do status de MGMT nas células tumorais é extremamente importante para o uso racional dessas drogas na quimioterapia de gliomas (CANKOVIC et al., 2013; HERMISSON et al., 2006; KAINA; MARGISON; CHRISTMANN, 2010; WELLER et al., 2010; WELLER et al., 2012). No entanto, na ausência de MGMT, o destino dessas lesões é completamente diferente.

O reparo de ICLs em células eucarióticas é complexo e o conhecimento atual a seu respeito é, em grande parte, teórico. Como mencionado anteriormente, pode envolver as vias de FA e HR. Por outro lado, as lesões O6-meG, quando não reparadas por MGMT, levam a um pareamento errôneo da O6-meG com T durante a replicação (TOORCHEN; TOPAL, 1983). Este mau pareamento é reconhecido por MMR. Porém, MMR persiste na inserção de T em oposição à O6-meG, num ciclo fútil que, acredita-se, é capaz de gerar lesões terciárias, presumivelmente sítios que dão origem a DSBs (DUCKETT et al., 1996; KAINA et al., 2007).

Devido ao efeito dessas drogas de modularem fortemente nas células os processos de reparo e de respostas ao dano no DNA, torna-se de fundamental importância entender e controlar esses processos, o que possibilitaria o desenvolvimento de novas terapias que contornassem as defesas da célula tumoral e aumentassem, por isso, a eficácia do tratamento quimioterápico empregado.

Figura 9. Esquema ilustrativo das principais lesões induzidas por ACNU e TMZ. Em **A**: (1.) O radical cloroetil da molécula de ACNU realiza um ataque nucleofílico na posição O6 da guanina, gerando uma molécula O6- cloroetilGuanina (2.). Esta sofre um rearranjo molecular espontâneo, gerando N1-O6-cloroetilGuanina (3.), que é capaz de formar uma ligação cruzada (ICL) com a Citosina (4.). (5.) e (6.) representam as etapas em que a enzima MGMT pode reparar ou prevenir a lesão no nucleotídeo afetado. Em **B**: (1.) a pró-droga TMZ se decompõe espontaneamente em MTIC (2.). MTIC se decompõe, formando um metabólito inativo (AIC) e um íon metildiazonium (3.) capaz de realizar o ataque nucleofílico na posição O6 da Guanina (4.), levando à formação de O6-metilGuanina. Esta molécula é então erroneamente pariada com a Timina (5.). (6.) e (7.) representam os passos em que a enzima MGMT pode reparar ou prevenir a lesão no nucleotídeo afetado.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve, portanto, os seguintes objetivos:

- I. Investigar as causas da resistência de células de glioma selvagens para *TP53* (em relação a TP53 mutada) ao tratamento com ACNU. Este objetivo do projeto é a continuação direta do trabalho desenvolvido pelo nosso grupo e publicado há alguns anos (BATISTA et al., 2007).
- II. Verificar a influência dos genes da via de reparo de NER e TLS- (XPA, XPC, XPF e XPV) no reparo de ligações no DNA causadas por ACNU.
- III. Verificar a influência de DNA-PK (NHEJ) no reparo de lesões induzidos pelo ACNU.
- IV. Investigar o efeito dessas vias de reparo estudadas na remoção de lesões do tipo ICL induzidas por ACNU.
- V. Utilizar a ferramenta de RNAi para o *knockdown* de genes de reparo de DNA em células tratadas com ACNU. Este objetivo visa também buscar estratégias que possam aumentar a eficiência do tratamento com esses agentes quimioterápicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Culturas celulares

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho e suas principais características estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho. Nome de cada linhagem celular, sexo do doador das células, principais alterações genótípicas, fenótipo, origem tecidual e as principais referências em relação a elas. As linhagens C5RO e XP51RO foram gentilmente cedidas pelo Dr. J.Hoejmakers da Universidade de Roterdã, Holanda.

Linhagem celular (sexo)	Genótipo relativo ao reparo de DNA	Fenótipo	Origem	Referências
MRC5 (M)	Selvagem	WT	Fibroblastos de pulmão; imortalizados com SV40.	(JACOBS; JONES; BAILLE, 1970)
C5RO	Selvagem	WT	Fibroblastos imortalizados com h-TERT	(BHAGWAT et al., 2009) (ZHU et al., 2003) (AHMAD et al., 2010)
XP12BE (F)	G>T intron 3 (último nt) receptor de splicing; G>C doador de splicing exon 4 (XPA mt)	XP-A	Fibroblastos de paciente XP-A; imortalizados com SV40.	(HULL; KANTOR, 1983) (LAI et al., 2013)
XP44RO (M)	c.1643_1644delTG; p.Val548AlfsX572 (homozigose) (XPC mt)	XP-C	Metástase de melanoma de XP-C; imortalizados com SV40.	(KEIJZER et al., 1989) (LAFARGE-FRAYSSINET et al., 1995)(DAYA-GROSJEAN et al., 1987)(SOUFIR et al., 2010)
XP51RO (M)	(XPF mt)	XFE	Fibroblastos imortalizados com h-TERT	(NIEDERNHOFER et al., 2006) (BHAGWAT et al., 2009) (AHMAD et al., 2010); (BOGLIOLO et al., 2013) (GREGG; ROBINSON; NIEDERNHOFER, 2011) (ZHU et al., 2003)
XP30RO	c. 104_116del113; p. Ala35fsX7 (homozigose) (POLH mt)	XP-V	Fibroblastos de pacientes XP-V; imortalizados com SV40.	(JOHNSON et al., 1999) (MASUTANI et al., 1999)
U87MG (M)	2N=46; marcadores: der(1)t(1;3) (p22;q21), der(16)t(1;16) (p22;p12), del(9) (p13); p53 wt PTEN mt	GBM	Tecido epitelial do cérebro	(CLARK et al., 2010) (LI et al., 1996) (OLOPADE et al., 1992)
U343MG (M)	Cariótipo humano hipoplóide com 20% poliploidia - 44(40-45)<2n>XXY/XXYY, -6, +7, -10, -14, -22, der(1)del(1)(p21)t(1;9)(q42;	GBM	Tecido epitelial do cérebro	(WESTERMARK, 1973) (WESTERMARK; MAGNUSSON; HELDIN, 1982) (NISTER; HELDIN; WESTERMARK, 1986)

	q34), der(9)t(9;16)(p13;p11)t(1;9)(q42;q34), der(16)t(9;16)(p13;p11), der(18)t(6;18)(p12;q12.2) – ganho de 7 e perda de 10 e 22 típicos em astrocytoma- oligodendroglioma de baixo graus- ganho de cromossomos sexuais (particularmente Y) são muito raros tem tumores. GFAP(+) p53 wt; PTEN wt			(WESTERMARK; PONTEN; HUGOSSON, 1973) (PONTEN; WESTERMARK, 1978)
U138MG (M)	Hiperplóide a pentaplóide com diversos marcadores [t(11;5), t(8q;4), t(19;?18), M1 e M2]. p53 mt; PTEN wt	GBM	Tecido epitelial do cérebro	(PONTEN; MACINTYRE, 1968) (OLOPADE et al., 1992) (MAHE et al., 2004) (HU et al., 2004)
U251MG (M)	Cariótipo humano hipotriploide com 15% poliploidia - 63(58- 63)<3n>XXY, +1, +7, -8, - 10, -12, -13, -14, -15, -16, - 18, -21, -22, +2mar, der(1)del(1)(q23)ins(1;4)(p3 2;q23q27), del(1)(q13), del(4)(q23q27), del(4)(q28q35), add(8)(q24), add(11)(p15), der(19)add(19)(p13)add(19)(q13) – grande submetacêntrico, der(19) e der(1) marker GFAP(+) p53 mt; PTEN mt	GBM	Tecido epitelial do cérebro	(GROSS et al., 1988) (PONTEN; MACINTYRE, 1968)
LN229 (F)	p53 wt (CCT (Pro) --> CTT (Leu), mutação silenciosa no códon 98), PTEN wt; del(p16); del(p14ARF).	GBM	Tecido epitelial do cérebro	(DISERENS et al., 1981) (ISHII et al., 1999) (SCHLAPBACH; FONTANA, 1997)

3.2 Cultivos celulares

As linhagens celulares de glioma utilizadas neste trabalho (U87MG (p53wt), U343MG (p53wt), U138MG (p53mt), U251MG (p53mt) e LN229 (p53wt)) e as linhagens celulares de fibroblastos humanos imortalizados: MRC5, XP12BE –XPA e XP4PA-XPC foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*- Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (*Fetal Calf Serum*-FCS; Cultilab). A linhagem XP30RO-XPV foi mantida em meio MEM com 10% de FCS e as linhagens C5RO e XP51RO-XPV em meio HAM'S F-10 com 15% de FCS. Todas elas foram mantidas em estufa aquecida a 37 °C e 5% de CO₂, em uma atmosfera úmida.

Os repiques de manutenção das linhagens eram planejados de acordo com a capacidade de duplicação de cada uma delas. De modo geral, tanto as linhagens de glioma quanto os fibroblastos importalizados por SV40 eram repicados aproximadamente duas ou três vezes por semana, numa proporção de 1:3, enquanto as linhagens de fibroblastos imortalizados por H-tert, uma vez por semana, na proporção de 1:2. As células eram mantidas em garrafas de 45 mL (Nunc). Para o repique, primeiramente o meio era sugado com uma pipeta *Pasteur* com o auxílio de uma bomba a vácuo. Em seguida, as células eram gentilmente lavadas com 10 mL de PBS, para total remoção do FCS remanescente. Após a retirada do PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 , 1 L H_2O destilada; pH 7,4- Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 1,5 mL de tripsina (+EDTA, Cultilab) era acrescentado à garrafa por 3 a 5 min, na estufa. A reação era então interrompida pelo acréscimo de 3,5 mL do respectivo meio preparado com FCS e a proporção determinada era mantida na garrafa completando-se o volume para 10 mL no total.

No máximo a cada dois meses, um novo lote de células era descongelado. O procedimento para o descongelamento dos criotubos contendo as células congeladas era o seguinte: após retirados do N_2 líquido (-196°C), as células eram imediatamente colocadas em banho maria, a 37°C . Após descongeladas, eram rapidamente transferidas para um tubo Falcon de 15 mL (Nunc) contendo 5 mL do meio apropriado e levadas à centrifugação por 5 min a 1500 rpm a 4°C . O sobrenadante era então descartado e as células ressuspensas em 5 mL do meio, sendo transferidas para garrafas de 5 mL (Nunc, Penfield, NY, USA). No dia seguinte, o meio era substituído, em mesmo volume, para evitar qualquer resíduo de DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) na cultura. Após o crescimento e confluência delas, as células eram tripsinizadas e transferidas para a garrafa de 45 mL. Somente a partir do segundo repique as células eram utilizadas para reposição do estoque de congelamento ou para os experimentos.

O congelamento das células se dava da seguinte maneira: as culturas em fase exponencial de crescimento eram normalmente repicadas e contadas para uma quantidade de um milhão de células por criotubo. As células eram então centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de FCS + 10% DMSO, e os criotubos colocados em containers de criopreservação no Congelador a -80°C *overnight*. No dia seguinte eram transferidas para o N_2 líquido.

3.3. Tratamentos

As drogas utilizadas neste trabalho foram os agentes alquilantes ACNU e TMZ (ambos Sigma-Aldrich- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). O ACNU era pesado e rapidamente diluído a uma concentração-estoque de 10 mM em água destilada autoclavada, filtrado (filtros Millipore, 10 μM) e distribuído em alíquotas de 1 mL em microtubos (*Eppendorf*, Hamburg-Nord, Hamburg,

Alemanha), que eram mantidos em congelador a -80 °C. Já a droga TMZ, após pesada, era rapidamente diluída em 30,9% DMSO (Merck) a uma concentração-estoque de 22 mg/mL. Então 2013 µL de H₂O era adicionada a 900 µL da diluição para uma concentração- mãe de 35 mM e distribuída em 1 mL em microtubos e igualmente mantidos no congelador a -80 °C. Para utilização das drogas nos tratamentos das células, as alíquotas eram rapidamente descongeladas, diluídas (por diluição seriada) nas concentrações e volumes apropriados a cada tipo de experimento. As células eram sempre tratadas uma única vez (tratamento contínuo, sem troca do meio de cultura) uma vez que ambas as drogas são bastante instáveis, com tempos de meia-vida muito curtos em meios de cultura suplementados.

O inibidor Ly294002 ((2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4 H-1-benzopyran-4-one; Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA)) foi diluído em DMSO e distribuído a uma concentração estoque de 10 mM, em alíquotas de 200 µL conservadas em congelador a -20 °C. O seu uso se dava como um pré-tratamento ao ACNU, em doses sub-tóxicas (1 µM para as linhagens de fibroblastos e 2 µM para as linhagens de GBMs), sendo mantido no meio após o tratamento com ela (pré-co-tratamento).

3.4 Silenciamento Gênico

O silenciamento gênico foi feito utilizando-se da tecnologia de RNA interferência (RNAi), que é um silenciamento transiente. Os siRNAs utilizados (Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA) eram ressuspensos em tampão Rnase-*free* a uma concentração de 100 µM, alíquotados no volume de 5 µL em microtubos de 0,5 mL e mantidos no congelador (-20 °C) até o momento da sua utilização. No primeiro dia do experimento, aproximadamente 50000 células da linhagem tumoral U87MG (p53wt) eram plaqueadas. 24 h depois eram transfectadas utilizando-se a mistura de 5 µL de Lipofectamina (Lipofectamine RNAiMax Reagent, Invitrogen) e dos siRNAs de interesse, que foram: siScr, siXPC, siXPF, siPOLH e siPOLK (10-20 nM, conforme recomendação do fabricante). Para a confirmação do silenciamento dos genes de interesse, 48 h após a transfecção as células eram coletadas para análise da expressão protéica (Western-Blott). Para análise do efeito do silenciamento frente ao tratamento com ACNU, as células eram plaqueadas e transfectadas após 24 h. Transcorridas outras 24 h após a transfecção as células eram tratadas com ACNU e coletadas 48 e 72 h após o tratamento para as análises de imunofluorescência (IF) e 144 h após para as análises de sensibilidade (Anexina V-PI).

3.5 Sobrevivência Celular – Recuperação Clonogênica

Aproximadamente 1.500 células foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Até 16 h após, as células eram tratadas com diferentes concentrações de ACNU e mantidas em meio completo por duas semanas. Percorrido o período, as células eram fixadas em formaldeído 10% (Merck) por 20 min e imediatamente coradas com Cristal de Violeta 1%. Colônias com mais de 8 células eram contadas e a taxa de sobrevivência estimada em relação ao número de colônias obtidas nas amostras controles (não- tratadas).

3.6 Viabilidade Celular – XTT

Os experimentos de viabilidade celular foram realizados com o *Cell Proliferation Kit II* (XTT, Roche, Basel, Suécia). O teste de XTT é um teste colorimétrico que mede a viabilidade celular com base na atividade de enzimas mitocondriais, que em células viáveis e na presença de um agente desacoplador de elétrons, reduzem o sal tetrazolium ao sal solúvel formazan (mudando a sua absorbância, que se correlaciona com o número de células vivas). Essas enzimas são inativadas logo depois da morte celular. 10.000 células/poço foram plaqueadas em placas *multiwell* de 6 e deixadas por 48 h para recuperação. Decorrido o período, as células foram tratadas com diferentes doses de ACNU, na presença ou ausência de Ly294002 (1 μ M). Depois de seis dias, o meio foi descartado, as placas lavadas com PBS e acrescentou-se 800 μ L da mistura do agente desacoplador de elétrons com o reagente de marcação, numa proporção de 1:50, por 4 h. 200 μ L do produto da reação foram transferidos para placas de 96-wells e a absorbância lida nos comprimentos de onda de 492 e 650 nm (A_{492} - A_{650}). Os resultados foram expressos em relação às amostras não tratadas.

3.7 Análise do conteúdo de Sub-G1 por citometria de fluxo

10.000 células foram plaqueadas em placas *multiwells* de 6 poços e deixadas em incubação por 48 h para recuperação. Após, eram tratadas com diferentes concentrações de ACNU ou TMZ. Decorridas 144 h a partir do tratamento, as células eram coletadas juntamente com seu sobrenadante e centrifugadas (1500 rpm, 15 min). O precipitado resultante era então fixado com etanol (Merck) 70% gelado e armazenado por até duas semanas à -20 °C. Anteriormente à análise, as células eram tratadas com RNase A (Invitrogen) (0.03 mg/ml) e marcadas com iodeto de propídeo (Propidium Iodide- PI; 16.5 mg/ml). Este é um agente capaz de se intercalar entre as bases do DNA e sua fluorescência corresponde à quantidade de DNA presente na célula. Os

eventos apoptóticos - representados pela fração de células que sofreu fragmentação do material genético - eram analisados por citometria de fluxo (Guava, GE, Little Chalfont, Reino Unido), quando as percentagens de núcleos sub-diplóides eram contadas.

3.8 Dupla marcação de Anexina V/PI por citometria de fluxo

O teste de Anexina V-PI foi o teste de escolha para a observação do efeito do silenciamento gênico nas células de glioma (U87MG), pois é um método eficiente para detecção e discriminação de uma amplitude maior de eventos: permite a separação entre células apoptóticas, necróticas e células viáveis. Baseia-se no princípio de que na maioria das células eucarióticas viáveis, o fosfolípido negativamente carregado Fosfatidilserina (PS) está localizado na camada citosólica da bicamada lipídica. A redistribuição da PS da camada interna da membrana para a camada externa é um evento inicial e disseminado da apoptose. Porém, na necrose, a PS torna-se acessível devido a ruptura da integridade da membrana plasmática, que não é capaz de impedir a entrada também de PI. Desta forma, células apoptóticas tornam-se marcadas positivamente para Anexina V-FitC que se ligam a PS, mas são negativas para marcação por PI. Células necróticas ou mortas coram-se positivamente para Anexina V-FitC e PI, enquanto células viáveis são negativas para ambas as marcações.

50.000 células eram plaqueadas e no dia seguinte transfectadas com o siRNA de interesse. Após 24 h, eram tratadas com ACNU. Transcorrido o período de tratamento (144 h), as células eram coletadas, transferidas para tubos Falcon de 15 mL, centrifugadas (1000 rpm, 5 min), lavadas com PBS duas vezes e novamente centrifugadas. A partir deste ponto, todo o procedimento era realizado utilizando-se o Kit Anexina V-FitC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). As amostras eram então ressuspensas em 50 µL de tampão de ligação e mais 2,5 µL de Anexina V eram adicionados às amostras. Essas eram assim mantidas no gelo e no escuro por 20 min. Transcorrido o tempo, 430 µL do tampão de ligação eram acrescidos, juntamente com 10 µL de PI (50 µg/ml) e as amostras levadas imediatamente para citometria (FACS Canto, BD, East Rutherford, New Jersey, USA), quando a percentagem de células viáveis, apoptóticas ou necróticas eram determinadas.

3.9 Imunofluorescência por citometria de fluxo

10.000 células foram plaqueadas em placas *multiwells* de 6 poços e deixadas em incubação por 48 h para recuperação. Após, eram tratadas com suas respectivas LD₅₀ de ACNU na presença

ou ausência de Ly294002 (1 μ M). Decorrido o tempo de tratamento, as células eram coletadas juntamente com seu sobrenadante e centrifugadas (1500 rpm, 15 min). Para a fixação, 500 μ L de formaldeído 1% recém preparado era adicionado ao precipitado, incubado por 15 min em gelo e novamente centrifugado (8.000 rpm, 10 min). O precipitado era novamente ressuspensão em etanol 70% gelado e deixado *overnight* a -20 °C. Decorrido o período, as células foram permeabilizadas e bloqueadas pela adição de 500 μ L de PBS-T-BSA (Triton X-100 0,2% + BSA 1% em PBS). Após centrifugação (8.000 rpm, 10 min) e retirada do sobrenadante, 50 μ L do anticorpo primário (anti- γ H2AX ser 139- Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) diluído em PBS-T-BSA a 1:300 foi adicionado e mantido por 1 h a temperatura ambiente. Depois de duas lavagens com PBS-T-BSA, 50 μ L do anticorpo secundário (anti-mouse FitC, Sigma-Aldrich) diluído em PBS-T-BSA a 1:200 foi adicionado e mantido pelo mesmo período anterior. Após, duas outras lavagens eram efetuadas e o precipitado ressuspensão em 200 μ L de solução de PI, para marcação do DNA. As células eram, então, mantidas durante a noite a -20 °C e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

3.10 Host cell reactivation (HCR)

3.10.1 Produção dos plasmídeos de interesse para os diferentes experimentos

Para obtenção dos plasmídeos necessários ao silenciamento gênico, e para os experimentos de HCR (Figura 10), 1 μ L do plasmídeo de interesse (pShuttle/Luc para o relaxamento plasmidial e pShuttle/Luc e pShuttle/RL para HCR) foi adicionado à uma alíquota de bactéria eletrocompetente (50 μ L). O conteúdo dos microtubos foi transferido para cubetas previamente imersas em gelo e procedeu-se o eletrochoque a 2,5 kV (Bio-Rad Pulse Controller Pulse, Gene Pulser II, Hercules, California, USA). Imediatamente após o choque foi adicionado em cada tubo 450 μ L meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 100 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose, pH 7,4) e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h, sob agitação. Decorrido o tempo de incubação necessário para que as bactérias se recuperem do choque elétrico, 100 μ L da amostra incubada foi plaqueada em meio LB-água (LB acrescido de 1,5% de água) contendo antibiótico indicado para a seleção bacteriana e a placa então foi incubada *overnight* a 37 °C.

Figura 10. Representação da construção dos vetores utilizados nos ensaios de HCR. **A.** pLKO – utilizado como controle do silenciamento gênico; **B.** pShuttle – utilizado no teste de relaxamento plasmidial e; **C.** pShuttle/RL e **D.** pShuttle/Luc.

No dia seguinte, colônias bacterianas foram crescidas em 2 mL de meio LB líquido com o antibiótico adequado para seleção e incubadas a 250 rpm a 37 °C *overnight*. As culturas líquidas foram centrifugadas a 14000 rpm a temperatura ambiente por 2 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 200 µL de Tris-EDTA (TE) contendo RNAase (200 mg/mL). Adicionou-se 200 µL de solução de lise (100 µL 0,4M NaOH e 100 µL SDS 2%) e após 5 min à temperatura ambiente foram adicionados 150 µL de 3 M de acetato de sódio (pH 4,5), seguindo-se a centrifugação a 14000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Então, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos microtubos onde foram adicionados 1 mL de isopropanol (Merck), procedendo-se mais uma centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes resultantes foram descartados e os precipitados lavados com 600 µL de etanol 70%. As amostras foram submetidas à nova centrifugação a 14000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Novamente os sobrenadantes foram descartados e os tubos invertidos sob

papel absorvente e deixados à temperatura ambiente até secarem completamente. Os precipitados foram então ressuspensos em 50 µL de TE contendo RNAase, quantificados através do Nanodrop (ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Alemanha) e estocados a -20 °C.

3.10.2 Ensaio de HCR

Após a obtenção dos plasmídeos de interesse (pShuttle/Luc e pShuttle/RL) (item 2.10.1), alíquotas de pShuttle/Luc foram tratadas com doses de 3, 10, 30 e 100 µM de ACNU por 24h a 37 °C. Decorrido o tempo, os plasmídeos eram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20. O kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega, EUA) foi utilizado para medir a atividade do gene repórter luciferase, que permite uma medida indireta da capacidade de reparo de DNA celular. Esse sistema permite a leitura dos dois genes repórteres no mesmo ensaio: Luciferase, do pShuttle-Luc; e Renilla, do pShuttle-RL. Este último plasmídeo funciona como um controle utilizado para a normalização do resultado, auxiliando na interpretação dos dados por minimizar as diferenças relacionadas à eficácia da transfecção e do número de células, tornando a análise mais acurada.

A leitura da atividade de luciferase foi realizada utilizando-se luminômetro GloMax (Promega). A luminescência detectada pelo luminômetro foi gerada pela ação da luciferase ou renilla sobre seus respectivos substratos (luciferina ou coelenterazina), sendo que cada um dos produtos dos genes repórteres emitem luz em comprimentos de onda diferentes sendo, por isso, facilmente distinguíveis.

3.11 Teste do Cometa adaptado para detecção de ICLs

O teste do cometa utilizado foi uma modificação do *Single Cell Gel electrophoresis Assay* (SCGE), como descrito anteriormente (USANOVA et al., 2010). 100 mil células em fase exponencial de crescimento eram plaqueadas e tratadas com 100 µM de ACNU. As células eram coletadas em diferentes tempos após o tratamento (24 até 144 h) e mantidas em gelo. Todas as amostras tratadas foram submetidas a 8 Gy de radiação γ (Gammacell, 2000; Molsgaard Medical, Heorsholm, Dinamarca), além dos controles não-irradiados e não-tratados. Após, os precipitados eram apropriadamente diluídos, ressuspensos em agarose de baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich-Aldrich) e transferidos para as lâminas pré-tratadas com agarose normal (Sigma-Aldrich-Aldrich). As lâminas eram mantidas então no escuro até a completa solidificação do meio e então submersas em tampão de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/NaOH, 1% Na-

Laurylsarcosinato, 1% Triton X100, 10% DMSO, pH 10) por 10 min. Decorrido o tempo, as lâminas eram levadas à eletroforese alcalina (com tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, gelado), no escuro, por 20 min. As lâminas eram neutralizadas por 5 min em tampão de neutralização (0.4 M Tris, pH 7.5) e as células eram então fixadas em etanol absoluto por 5 min, retiradas da cuba e deixadas isoladas *overnight* para secagem. Anteriormente à análise das lâminas, estas eram coradas com 10 μ L (50 μ M) de brometo de etídeo e levadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Microphot-FXA). 50 células por *slide* eram analisadas usando o *Software Comet Assay 4.0.2* (Kineti Imaging Ltd, Liverpool, Merseyside, Inglaterra). O parâmetro de escolha para descrever a taxa de migração do DNA foi o *Tail Moment* (TM). A presença de ICLs retarda a migração das alças relaxadas do DNA superenovelado durante a eletroforese, resultando em um TM reduzido em relação ao controle não-tratado. A quantidade de ICLs foi determinada comparando-se o TM das amostras tratadas e irradiadas com os controles não-tratados e não-irradiados. O nível de ICLs é proporcional ao decréscimo no TM.

3.12 Imunofluorescência (IF) por microscopia

Anteriormente à realização do experimento propriamente dito, as lamínulas eram devidamente preparadas para serem utilizadas na cultura celular: primeiramente, eram imersas por 20 min em dietiléter (Roth, Karlsruhe, Alemanha) e enxaguadas numa série de etanol 100%, 70% e água destilada. Então, lavadas por 20 min em 1 N HCL em agitador. Depois deste tempo, as lamínulas eram lavadas com água destilada e mantidas em etanol 70% na geladeira até o momento de sua utilização.

Para o plaqueamento, as lamínulas foram retiradas do etanol, rapidamente secas pela chama do fogo no bico de Bunsen e colocadas no centro de cada *well* das placas de 6. Ali, eram ligeiramente enxaguadas com 2 mL de PBS estéril e 50.000 células da linhagem U87MG (p53wt) eram então plaqueadas. No dia seguinte, as células eram silenciadas conforme descrito no item 2.2 desta seção, 24 h depois tratadas com ACNU e 48 h após o tratamento submetidas ao procedimento de fixação e coloração. Para fixação, o meio de cultura foi sugado, as *wells* contendo as lamínulas lavadas rapidamente com PBS e as células fixadas em 2 mL de metanol: acetona (7:3) (ambos Roth, Karlsruhe, Alemanha) por 8 min a -20 °C. Decorrido o período, a solução foi removida e descartada. Novamente, as células eram lavadas 3 vezes por 5 min com 4 mL de PBS. Para evitar a ligação inespecífica do anticorpo primário, as lamínulas eram bloqueadas com 100 μ L de soro de cabra (Invitrogen) (10%) mais 0,25% de Triton- X (Sigma-Aldrich) em PBS filtrado, por 1 h em câmara úmida. Logo, o agente bloqueador era removido e substituído por 100 μ L de solução contendo os anticorpos primários (solução de 0,25% Triton-

X/PBS mais anticorpo anti-*rabbit* anti-53BP1 (1:400, Cell Signalling) e anti-*mouse* anti-phospho-H2AX (1:10.000, Millipore). Nesta solução as células eram incubadas *overnight* a 4 °C.

No dia seguinte, as lamínulas eram lavadas duas vezes com PBS (5 min), uma vez com PBS *high salt* (PBS 0.4 M NaCl) por 2 min e uma vez com PBS (5 min), à temperatura ambiente. Assim, as células eram então incubadas em solução de 0.25% Triton- X/PBS contendo os anticorpos secundários (*goat* anti-*mouse* Alexa 488 (anti- F(ab)2 (1:300)) e *goat* anti-*rabbit* Cy3 (1:600)), por 1 h, no escuro, à temperatura ambiente. As lamínulas eram novamente lavadas duas vezes com PBS (5 min), uma vez com PBS *high salt* por 2 min e uma vez com PBS (5 min), à temperatura ambiente. A coloração nuclear era feita pela adição de 100 µL de solução To-Pro-3 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Ma USA) (1 µM) em PBS e incubação por 15 min à temperatura ambiente, no escuro.

Paralelamente, durante o período das lavagens, as lâminas eram preparadas para receber as lamínulas, sendo lavadas com etanol 70%, secas com lenço de papel e nomeadas. Antes de receber as lamínulas, 10 µL da solução de Vectashield (VectorLabs) era colocada na lâmina. As lamínulas eram então gentilmente mergulhadas em PBS, viradas ao contrário e colocadas em cima do meio anti-*fade* previamente colocado na lâmina. Delicadamente, com um lenço de papel, o excesso de líquido era retirado das lâminas e as bordas entre as lamínulas e lâminas vedadas com esmalte incolor (disponível comercialmente em qualquer farmácia). Estas eram guardadas no escuro, a 4 °C, até a hora da microscopia, realizada em microscópio LSM (“*Laser Scanner Microscope*”). As imagens eram obtidas e analisadas com ajuda dos *softwares* LSM Image Browser e ImageJ, com o qual o número de foci/célula de γH2AX (verde), 53BP1 (vermelho) e a co-localização deles (branco-amarelado) eram contados.

3.13 Expressão protéica

3.13.1 Extração protéica a partir das linhagens celulares e das amostras de tecidos do cérebro

O protocolo utilizado para a extração protéicas das linhagens celulares foi o seguinte: Após o tempo de transfecção com siRNA e decorrido o tempo do tratamento com a droga (144 h), o meio era sugado e as placas contendo as células aderidas lavadas com PBS gelado. Após a sucção completa do PBS, 80 µL do tampão de carregamento eram diretamente adicionados às placas, homogeneizados e transferidos para microtubos, em gelo. As amostras eram aquecidas a 95 °C por 5 min e novamente inseridas no gelo. Em seguida eram sonicadas (Sonifier Cell

Disruptor B15 from Branson Ultrascall - Dietzenbach, Alemanha) e mantidos em congelador a -20 °C até o momento da eletroforese.

As amostras dos tecidos tumorais classificados como GBMs foram comparadas com extratos de tecido normal do cerebelo, disponíveis comercialmente (BioChain, Hayward, CA, USA). Para a preparação do extrato total do tumor, os tecidos congelados eram esmagados e transferidos para tubos pré-resfriados, sonicados em 180 µL do tampão (20 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA, pH 8; 1 mM β-mercaptoethanol; 5% glycerin; inibidores de proteases: aprotinin 10 µg/ml; bestatin 10 µmol/l; leupeptin 10 µmol/l, pepstatin A 1 µmol/l, PMSF 0.1 mmol/l) e centrifugados a 14000 rpm, a 4 °C por 10 min. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford com Roti-quant® (Roth, Karlsruhe, Alemanha). As amostras eram então preparadas por diluição para estarem a uma concentração final de 1 µg/µL, utilizando-se o tampão de carregamento (4x) e água milique (1:3 v/v). As amostras eram aquecidas a 95 °C por 5 min e mantidas em congelador (-20) até a hora da eletroforese.

3.13.2 Bradford

O método de Bradford é um procedimento colorimétrico simples e acurado para determinação da concentração de proteínas solubilizadas. Envolve a adição de um corante ácido a uma solução protéica, na qual a mudança diferencial da cor do reagente ocorre em resposta às diferenças na concentração protéica das amostras. O corante do reagente, azul de *Comassie*, liga-se primariamente a resíduos básicos e resíduos aromáticos, especialmente argenina. A construção de um gráfico da concentração protéia das amostras padrão versus a DO (Densidade Óptica) obtida a partir da leitura em espectrofotômetro permite a obtenção de equação da reta da qual pode-se estimar a concentração protéica das amostras.

A curva protéica padrão foi derivada de 5 diluições de uma solução de albumina bovina (Sigma-Aldrich-Aldrich, Reino Unido), em triplicata, numa amplitude de 0,05 mg/mL até 5 mg/mL. 10 µL dessas diluições e das diluições das amostras teste de tecidos tumorais eram pipetadas em diferentes *wells* de uma microplaca de 96 wells. Após a adição de 200 µL do reagente em cada *well*, a placa era agitada vigorosamente e incubada por no mínimo 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, procedíamos com a leitura da absorbância (595 nm).

3.13.3 Imunodeteccão por Western-Blot

O protocolo utilizado foi baseado no método de Renart et al., 1979. 45 µL das amostras dos experimentos das linhagens celulares silenciadas ou 30 µL (30 µg/*well*) das amostras de

tecidos tumorais em tampão de carregamento (50 mM Tris/HCl, 2% SDS, 10% Glicerol, 0,02% Azul de Bromofenol, 1% β -Mercaptoetanol) foram separados em géis de poliacrilamida (4% para o gel de empilhamento e 7,5 a 10%, dependendo da proteína de interesse, para os géis de separação- 5%/ 7,5% / 10% / 12,5%, respectivamente 1,5 ml/ 2,3 ml /3 ml /3,6 ml Rotiphorese Gel 40, 3 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 ,2 ml /6,5 ml /5,7 ml /5,1 ml dH₂O, 120 μ l 10% SDS, 60 μ l 10% APS, 6 μ l TEMED) com eletroforese a 40 mA. Após a separação das proteínas, estas eram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran; Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) *overnight* a 100 mA. As membranas eram então bloqueadas por 1 h em tampão de bloqueio (5% leite desnatado (Frema Reform, Granovita, Mainz Alemanha), 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6) e incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário (anti-XPC -1:500, anti-POLH- 1:500 e anti-POLK- 1:500 nos experimentos de silenciamento gênico e anti-Por H-1:500 e anti-POLK-1:500 nas amostras de tecidos normais ou GBM. Em ambos os casos, β -actina- 1:2000 foi o controle de escolha - todos anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA).

Então, após 3 lavagens (10 min) em TBS-T, as membranas eram incubadas em anticorpo secundário do tipo IR-Dye (corante infravermelho) (IRDye 800 CW Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Alemanha ou IRDye 800 CW Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Alemanha), também novamente *overnight*. Decorrido o período, as membranas eram novamente lavadas com TBS-T, 3 vezes, secas e escaneadas para detecção da fluorescência verde no escaner de detecção (*Odyssey*, LI-COR Bioscience, Lincoln, Nevada, USA). O silenciamento gênico era mensurado a partir das porcentagens nas diferenças relativas em relação ao controle (β -actina, Santa Cruz Biotechnology Inc).

3.14 Análises estatísticas

Antes de realizarmos as análises estatísticas finais, primeiro procedemos na investigação da natureza dos dados obtidos. Depois de avaliar se os dados apresentavam uma distribuição normal, ou seja, paramétrica – observando-se os histogramas de distribuição dos dados e através de testes estatísticos específicos para normalidade dos dados (testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnof), concluímos que os testes paramétricos eram os que se encaixavam para as análises dos dados. Exceto para os casos de análise do teste de cometa e WB, como o objetivo era sempre a comparação múltipla das médias, verificamos se os pré-requisitos para a análise de variância (ANOVA) se cumpriam nos dados. ANOVA foi, desta forma, o teste de escolha, não

só por permitir a comparação múltipla de médias, mas por ser um teste bastante robusto, que inclusive comporta pequenos desvios da normalidade e da homogeneidade de variâncias, sem comprometer o erro tipo 1 ou α . Para tanto, os dados foram testados para normalidade dos resíduos, homogeneidade de variâncias (através dos testes de Cochran ou Bartlett) e independência (Qui-Quadrado - χ^2). Cumpridos esses requisitos, realizamos a ANOVA seguida de Tukey (outro teste bastante robusto e conservador), para discriminar quais médias diferiam entre si.

Para comparação da frequência de expressão protéica das proteínas POLH e POLK em tecidos cerebrais normais versus amostras de GBMs, utilizamos o teste de χ^2 , considerando a frequência obtida nos tecidos normais como a frequência esperada para cada proteína.

No teste do cometa, utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das médias obtidas, seguido do teste U de Mann-Whitney. Todas as análises foram feitas utilizando-se do *software* Minitab Inc 16 (Colônia, Alemanha).

4 RESULTADOS

4.1 Influência de NHEJ na viabilidade de células de gliomas tratados com ACNU

Como descrito anteriormente, a droga ACNU é um quimioterápico capaz de formar ICLs no DNA, que podem bloquear a forquilha de replicação, levando à formação DSBs. Estas, por sua vez, podem culminar na morte celular. Para testar se o reparo das lesões induzidas por ACNU dependem da via de NHEJ, nós pré-tratamos as diferentes linhagens de glioma por 1 h com uma dose sub-tóxica de 2 μ M de Ly294002- um inibidor da via de PI3K e, por consequência, da via de PTEN e também de DNA-PK (KNIGHT, 2010). Decorrido esse tempo, as células foram co-tratadas com diferentes concentrações de ACNU e tiveram sua viabilidade analisada através do teste de XTT após 144 h do tratamento. Na **Figura 11A**, pode-se observar que a linhagem U87MG, a qual é selvagem para *TP53* e mutada para *PTEN*, responde de forma dose-dependente ao tratamento com ACNU e ao pré-co-tratamento com ACNU e Ly294002. A sensibilidade desta linhagem aos tratamentos atinge um platô para doses maiores que 10 μ M. Porém, não há diferença significativa entre os dois tipos de tratamento, revelando que o inibidor Ly294002 não é capaz de sensibilizar essas células aos efeitos tóxicos do ACNU.

De maneira semelhante, na **Figura 11B**, pode-se observar que a linhagem U343MG, selvagem para *TP53* e selvagem para *PTEN*, também mostra uma relação dose-resposta aos dois tipos de tratamentos e nenhum efeito de sensibilização da droga ao inibidor. No entanto, esta linhagem mostra-se mais sensível em relação à U87MG para doses mais altas. Na análise da

Figura 11C observa-se que a linhagem U251MG, mutada tanto para *TP53* quanto para *PTEN*, revela-se como a linhagem mais sensível em comparação com as outras em função do tratamento com ACNU e uma sensibilidade inalterada quando pré-co-tratada com Ly294002. Enfim, na **Figura 11D**, observa-se que o comportamento da linhagem U138MG, mutada para *TP53* e selvagem para *PTEN*, é bastante sensível ao tratamento com ACNU. De forma semelhante, também não é observada qualquer diferença entre o tratamento com ACNU e ACNU + Ly294002.

No sentido de não deixar qualquer dúvida em relação à participação da via de NHEJ na remoção das lesões induzidas por ACNU, nós ainda recorremos à utilização do inibidor NU2076, mais específico para DNA-PK (**Figura 11E**). A linhagem celular LN229 (p53wt e PTENwt) foi pré-tratada com 0,2 μ M de NU2076 e, decorrido o período de uma hora, tratada com diferentes concentrações de ACNU. 144 h depois foram analisadas pelo método de XTT. Os resultados confirmam, novamente, que o inibidor de DNA-PK não foi capaz de sensibilizar as células frente ao agente quimioterápico ACNU.

Figura 11. Viabilidade celular de gliomas ao quimioterápico ACNU. Diferentes linhagens de glioma foram tratadas com ACNU, ACNU e Ly294002 ($2\mu\text{M}$) ou ACNU e Nu2076, recolhidas 144 h após o tratamento e analisadas por XTT. **A.** U87MG (p53wt); **B.** U343MG (p53wt); **C.** U251MG (p53wt); **D.** U138MG (p53wt); **E.** LN229 (p53wt). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada. As curvas de tendência representam o *Best-Fit* ($p < 0,05$).

4.2 Influência de NHEJ na indução de apoptose de células de gliomas tratados com ACNU

Para confirmar os dados obtidos na **Figura 11**, nós também analisamos o conteúdo Sub-G1 gerados pelos tratamentos com diferentes doses de ACNU ou com o pré-co-tratamento de 2 μ m de Ly294002 e ACNU (**Figura 12**). Como esperado, os dados foram congruentes com os obtidos pelo método de XTT. Todas as linhagens, U87MG (**Figura 12A**), U343MG (**Figura 12B**), U138MG (**Figura 12C**) e U251MG (**Figura 12D**), com suas respectivas combinações no status de *TP53* e *PTEN*, se comportaram de modo semelhante ao descrito na **Figura 11**. As linhagens selvagens para *TP53* (U87MG e U343MG) se mostraram mais resistentes à indução de apoptose que as linhagens mutadas para este gene (U138MG e U251MG). Adicionalmente o pré-co-tratamento com Ly294002 não foi capaz de sensibilizá-las ao tratamento com ACNU. O conjunto desses dados mostram que Ly294002 não é capaz de sensibilizar as diversas linhagens estudadas ao quimioterápico ACNU e que as células *TP53* selvagem são mais resistentes ao tratamento com esta droga, enquanto as mutadas para esse gene, aparentemente, exibem maior sensibilidade.

Figura 12. Indução de apoptose em gliomas tratadas com quimioterápico ACNU. Diferentes linhagens de glioma foram tratadas com ACNU ou ACNU e Ly294002 (2 μM), recolhidas 144 h após o tratamento e o seu conteúdo Sub-G1 analisados por citometria de fluxo. **A.** U87MG (p53wt); **B.** U343MG (p53wt); **C.** U251MG (p53mt); **D.** U138MG (p53mt). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicata. As curvas de tendência representam o *Best-Fit* ($p < 0,05$).

Dentre os diversos tipos de lesões conhecidas, o reparo de ICLs ainda é o mais obscuro. A via de NER é a via mais robusta, apta para remover uma gama de lesões capazes de causar grandes distorções na dupla hélice do DNA. Por outro lado, a via de TLS evita a morte celular ao impedir uma parada da forquilha de replicação e desmonte do replissoma. Para testar se a via de NER ou a via de TLS participam da resistência das lesões induzidas pelo ACNU, nós testamos diferentes linhagens celulares de fibroblastos humanos derivadas de pacientes XP, que possuem mutações em diferentes proteínas nestas vias. As linhagens utilizadas, MRC5, XP12BE (XPAm), XP4PA (XPCmt) e XP30RO (XPVmt) são linhagens estabelecidas há anos, imortalizadas com SV40. Já as linhagens C5RO e XP51RO (XPFmt) foram estabelecidas recentemente e imortalizadas com h-Tert.

Para isso, utilizamos tanto os testes de XTT e de análise de sub-G1 (**Figura 13**). As linhagens foram tratadas com diferentes doses de ACNU até a dose máxima de 50 μ M e coletadas após um período de 144 h. Em todas as análises, seja de viabilidade ou de indução de apoptose (**Figura 13A, B, C e D**), as linhagens selvagens (MRC5 e C5RO) mostraram-se as mais resistentes em comparação com as linhagens carreadoras de qualquer mutação nas vias estudadas. Adicionalmente, todas as linhagens mostraram, em ambas as análises, perfis muito claros de uma relação dependente da concentração de ACNU (dose-resposta).

Na análise da **Figura 13A**, podemos observar que, quanto as linhagens mutadas na via de NER, XP-A mostrou-se mais sensível que MRC5. Na **Figura 13B**, também podemos perceber que a linhagem XP-F é bastante sensível ao ACNU. Doses baixas de ACNU (5-10 μ M) já mostraram-se suficientes para diferenciar o nível de sensibilidade de cada linhagem. Esses resultados estão em perfeita congruência com a análise de Sub-G1, no qual podemos observar que XP-F (**Figura 13D**) é uma das linhagens mutadas na via de NER bastante sensível, assim como a linhagem XP-A e enfim, XP-C (**Figura 13C**). Devemos levar em conta, porém, que devido a diferença na natureza da imortalização entre XP-F versus XP-A e XP-C, qualquer comparação direta entre as células imortalizadas por h-Tert e SV40 deve ser mais cautelosa. Por isso, realizamos também um teste de clonogênese com as linhagens C5RO e XP-F. Para este teste, as células individualizadas foram tratadas até 16 h após o plaqueamento e após 14 dias o número de colônias (número de células maior ou igual a 8) foi contado com o auxílio de um estereocópio (**Figura 13B**). Os resultados confirmam, novamente, a grande sensibilidade de células XP-F ao ACNU.

Na comparação entre as linhagens de NER (XP-A e XP-C) e TLS (XP-V), podemos observar, tanto na **Figura 13A**, quanto na **Figura 13C**, que XP-V foi a linhagem mais sensível, indicando que ambas as vias estudadas podem estar comprometidas com o reparo das lesões induzidas pelo ACNU, mas, mais especialmente, TLS.

Figura 13. Efeito citotóxico do tratamento com ACNU em diferentes linhagens mutadas em NER ou TLS. **A.** Viabilidade celular das linhagens MRC5, XP-A, XP-C e XP-V, 144 h após o tratamento, analisadas por XTT. **B.** Sobrevivência clonogênica de C5RO e XP-F, 14 dias após o tratamento. **C.** Indução de Sub-G1 nas linhagens MRC5, XP-A, XP-C e XP-V, 144 h após o tratamento, analisadas por citometria de fluxo. **D.** Indução de Sub-G1 nas linhagens C5RO e XP-F, 144 h após o tratamento, analisadas por citometria de fluxo. Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicata. As curvas de tendência representam o *Best-Fit* ($p < 0,05$).

Considerando os resultados anteriores, que demonstraram que tanto a via de NER e de TLS devem contribuir para o reparo das lesões induzidas por ACNU, nós decidimos investigar se o inibidor da via de PI3K (especialmente DNA-PK) - Ly294002, seria capaz de atuar na sensibilização das linhagens celulares mutadas nas vias estudadas, implicando em uma interação entre as diferentes vias.

Todas as linhagens foram primeiramente pré-tratadas com a dose sub-tóxica de 1 μM de Ly294002 por 1 h e depois co-tratadas com doses crescentes de ACNU e analisadas após 144 h, através do teste de XTT. Conforme podemos verificar na **Figura 14A**, a linhagem selvagem utilizada como controle experimental, MRC5, apresenta-se resistente tanto ao tratamento com

ACNU quanto ao pré-co-tratamento com o inibidor, apesar de ligeiramente mais sensível na presença deste em doses menores.

Por outro lado, na **Figura 14B**, podemos observar que a linhagem mutada em *XPA* é significativamente sensível ao ACNU e o inibidor agiu no sentido de intensificar a perda da viabilidade celular induzida pelo quimioterápico, já a partir da dose de 10 μ M de ACNU.

Curiosamente, na **Figura 14C**, percebemos uma mudança no padrão das respostas celulares obtidas com as células mutadas em *XPF*, em comparação com células XP-A. Embora XP-F também pertença à via de NER e tenha-se mostrado bem sensível ao quimioterápico ACNU, desde doses baixas, inferiores a 5 μ M, o inibidor Ly294002 não foi capaz de sensibilizar esta linhagem.

Porém, este mesmo comportamento pode ser observado na **Figura 14D**, relativa à linhagem XP-V, deficiente na via de TLS por uma mutação no gene da polimerase translesão *POLH*. Nesta, novamente observamos que, embora XP-V seja extremamente sensível ao ACNU, esta possui exatamente a mesma resposta celular quando pré-tratada com agente inibitório Ly294002.

Este conjunto de dados nos mostra que, quanto à via de NER, apenas XPF poderia atuar na mesma via de DNA-PK, enquanto XPA poderia atuar em vias complementares. Da mesma forma, poderíamos inferir que a via de TLS, através da atividade de POLH, deve participar do reparo das lesões induzidas pelo ACNU conjuntamente com a via de DNA-PK, pela via de NHEJ. Ou, alternativamente, isso também poderia significar que na ausência de POLH e XPF, não haveria a formação de substratos para NHEJ.

Figura 14. Viabilidade celular em mutantes de NER e TLS após tratadas com ACNU e inibidor de NHEJ. Diferentes linhagens de NER ou TLS foram tratadas com ACNU ou ACNU e Ly294002 (1 μM), recolhidas 144 h após o tratamento e analisadas por XTT. **A.** MRC5; **B.** XP-A **C.** XP-C; **D.** XP-F e; **E.** XP-V. Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada. As curvas de tendência

4.5. Cinética da distribuição do ciclo celular de células XP diante do tratamento com ACNU e Ly294002

Com a observação de que o quimioterápico ACNU exerce um efeito indutor de morte celular nas linhagens estudadas, nós partimos para a análise de outros fenômenos que caracterizam as respostas celulares aos agentes citotóxicos/ genotóxicos. Com esta finalidade, nós selecionamos três linhagens: a linhagem controle, MRC5, a linhagem XP-A, que foi sensibilizada pelo pré-co-tratamento com Ly294002 e ACNU e XP-V, que embora sensível ao ACNU, não foi sensibilizada pelo inibidor.

O parâmetro de estudo definido foi a análise do ciclo celular, através da marcação com PI e citometria de fluxo. O programa utilizado para a análise do ciclo celular foi o ModFit. Uma única dose de cada tipo de tratamento foi escolhida, sendo esta a $DL_{50\%}$ de cada linhagem. O

controle não-tratado foi amostrado no período de 24 h, enquanto as amostras tratadas foram recolhidas a cada 24 h, até o último tempo de análise, 144 h.

Conforme podemos observar na **Figura 15A**, o controle não-tratado da linhagem MRC5 comporta-se como um ciclo celular normal, como esperado para a uma célula humana em fase exponencial de crescimento: a maior parte da população celular encontra-se nas fases mais longas do ciclo, G1 e G2 (44% e 34%, respectivamente), com uma pequena população em S (21%). O tratamento com a DL_{50%} de ACNU (29 μ M) leva a um rápido bloqueio na fase S (81%), já observado a partir de 24 h após o tratamento, e persistente até o período de 96 h (82%), quando a população predominante passa a ser a população em G2/M, até o período final de análise, 144 h (70% em 120 h e 83% em 144 h).

Por outro lado, podemos perceber que o controle- local (1 μ M de Ly294002), nesta mesma linhagem (**Figura 15B**), induz uma proporção maior das populações celulares em S (35%), ao contrário do controle não tratado (**Figura 15A**). Já as células pré-co-tratadas com DL_{50%} de ACNU (37 μ M) e Ly294002 (**Figura 15B**) sofrem um súbito aumento na população em G2/M, que cresce e se arrasta até o período de 96 h (de 59% em 24 h até 96% em 96 h). A partir deste ponto, há um grande aumento na população em S, que se estende até o último dia de amostragem (66% em 120 h e 75% em 144 h).

Na análise da linhagem XP-A, **Figura 15C**, também é possível notar que o controle não tratado assume a configuração esperada de um ciclo celular normal de uma célula em fase de exponencial de crescimento (46% em G1, 20% em S e 34% em G2). O tratamento com DL_{50%} de ACNU (30 μ M), porém, causa um longo bloqueio da população celular na fase S, nos períodos de 24 (68% da população), 48 (77%), 72 (70%) e 96 h (47%). No período de 120 h observamos um pequeno aumento na população em G2 (49%) e, após 144 h, o ciclo celular quase relembra totalmente as proporções observadas no controle não-tratado (46% em G1 27% em S e 27% em G2). A linhagem, no entanto, se comporta de forma diferente quando as células são pré-co-tratadas com DL_{50%} de ACNU (11 μ M) e Ly294002 (**Figura 15D**). O controle local (1 μ M de Ly294002) praticamente não apresenta diferenças nas proporções das populações nas fases G1 (45%), S (23%) e G2 (33%). Porém, o pré-co-tratamento revela um perfil diferenciado: até 48 h, exibe um bloqueio em G1/S (23% em G1 e 53% em S 24h e 39% em G1 e 39% em S em 48 h), que aparentemente se atenua em 72 h (38% em G1, 28% em S e 34% em G2). As células, então, entram em uma nova fase de bloqueio G1/S entre 96 (47% em G1 e 45% em S) e 120h (53% em G1 e 46% em S) e 144 h após o pré-co-tratamento as proporções de G1 (44%) e G2 (49%) aumentam enquanto a proporção da população em S torna-se mínima (7%).

Por outro lado, na linhagem XP-V, enquanto o controle negativo (não tratado) mantém as proporções normais de uma célula em crescimento exponencial (44% em G1, 19% em S e 37% em G2), observamos que ocorre apenas um pequeno aumento na proporção de S no

primeiro dia (24 h) de tratamento com $DI_{50\%}$ de ACNU (7 μ M) (31%). Após, ao longo das 144 h, quando comparado ao controle negativo (**Figura 15E**), não é possível observar nenhuma diferença substancial na proporção de células nas três fases do ciclo celular de XP-V. Da mesma forma, não é possível observar nenhuma diferença, ao longo do tempo, das proporções celulares em cada fase do ciclo celular quando pré-co-tratadas com $DI_{50\%}$ de ACNU (7 μ M) e Ly294002, comparadas com o controle local (43% em G1, 23% em S e 34% em G2) (**Figura 15F**).

Figura 15. Cinética do ciclo celular de fibroblastos humanos (até 144 h) frente ao tratamento com LD₅₀ de ACNU ou LD₅₀ de ACNU + Ly294002 (1 μ M), por citometria de fluxo. **A.** MRC5 ACNU (LD₅₀ = 29 μ M) ou **B.** ACNU (LD₅₀ = 37 μ M) + Ly294002 (1 μ M). **C.** XP-A - ACNU (LD₅₀ = 30 μ M) ou **D.** ACNU (LD₅₀ = 11,19 μ M) + Ly294002 (1 μ M). **E.** XP-V - ACNU (LD₅₀ = 7 μ M) ou **F.** ACNU (LD₅₀ = 7 μ M) + Ly294002 (1 μ M). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada. Os dados foram analisados com o programa *ModFit*.

4.6 Cinética do conteúdo de Sub-G1 de mutantes em NER e TLS diante do tratamento com ACNU e Ly294002

Com o intuito de otimizar as comparações entre as proporções celulares em cada fase do ciclo e facilitar o entendimento da dinâmica entre as transições das fases do ciclo (**Figura 15**) e a morte celular, nós também acompanhamos a cinética de indução do conteúdo de Sub-G1 em células MRC5, XP-A e XP-V- que reflete a indução da apoptose - com o mesmo delineamento experimental anterior (**Figura 16**): Uma única dose de cada tipo de tratamento utilizada, sendo esta a $DL_{50\%}$ de cada linhagem/tratamento. O controle não-tratado foi amostrado no período de 24 h, enquanto as amostras tratadas foram recolhidas a cada 24 h, até o último tempo de análise, 144 h.

Ao observar a **Figura 16A**, verificamos que a linhagem MRC5 apresenta uma clara relação dose-resposta diante dos tratamentos empregados. No entanto, não apresenta diferenças na indução da apoptose entre os tratamentos com $DL_{50\%}$ de ACNU (29 μ M) e $DL_{50\%}$ de ACNU (37 μ M) e Ly294002 em cada tempo de tratamento. A diferença mais marcante se dá a partir do tempo de 96 h, que ainda exibe uma indução menor que 50% (30%), enquanto os pontos de 120 e 144 h já exibem um nível de indução próxima à indução esperada (50%). Na **Figura 16B** também observamos que as células XP-A apresentam uma relação dose-resposta tanto com o tratamento $DL_{50\%}$ de ACNU (30 μ M) e $DL_{50\%}$ de ACNU e Ly294002 (11 μ M). A morte celular devido ao tratamento com $DL_{50\%}$ de ACNU já atinge níveis acima de 40% em 96 h. No entanto, verifica-se que a indução da apoptose é diferente entre os tratamentos $DL_{50\%}$ de ACNU e $DL_{50\%}$ de ACNU e Ly294002 ao longo do tempo, sendo que o pré-co-tratamento atrasa a morte celular até o último tempo de amostragem, 144 h, quando atinge o valor esperado (aproximadamente 50%).

Na **Figura 16C**, observa-se que a linhagem XP-V, sob os tratamentos com $DL_{50\%}$ de ACNU e $DL_{50\%}$ de ACNU e Ly294002 (ambos 7 μ M), não apresenta diferença entre si até 72 h de tratamento, mantendo os níveis de indução de apoptose próximos aos controles negativo e local. Porém, a partir de 96 h, o pré-co-tratamento atrasa a indução da morte celular das células até 120 h. Com 144 h, ambos tratamentos atingem os mesmos valores esperados (aproximadamente 50%).

Figura 16. Cinética do conteúdo de Sub-G1 de células mutantes em NER e TLS; (até 144 h) frente ao tratamento com LD₅₀ de ACNU ou LD₅₀ de ACNU + Ly294002 (1 μM), por citometria de fluxo. **A.** MRC5 ACNU (LD₅₀ = 29 μM) ou ACNU (LD₅₀ = 37 μM) + Ly294002 (1 μM). **B.** XP-A - ACNU (LD₅₀ = 30 μM) ou ACNU (LD₅₀ = 11,19 μM) + Ly294002 (1 μM). **C.** XP-V - ACNU (LD₅₀ = 7 μM) ou ACNU (LD₅₀ = 7 μM) + Ly294002 (1 μM). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada.

4.7 Cinética da indução de γH2AX em células humanas diante do tratamento com ACNU e Ly294002

Além de analisar a cinética do ciclo celular, nós escolhemos olhar para os níveis de H2AX fosforilado (γH2AX), que é um indicador de danos ao DNA, através do método de dupla marcação em citometria de fluxo. As linhagens MRC5, XP-A e XP-V foram amostradas como exemplos do comportamento de respostas aos danos induzido pelo delineamento experimental realizado, no qual uma única dose de cada tipo de tratamento foi utilizada, sendo esta a DL₅₀% de cada linhagem/tratamento. O controle não-tratado foi amostrado no período de 24 h, enquanto as amostras tratadas foram recolhidas nos tempos de 24, 72 e 144 h.

Como se pode observar pela **Figura 17A**, na linhagem MRC5, o tratamento apenas com Ly294002 induz níveis significativamente mais altos que seu par, sendo este o controle não-tratado. Embora essa diferença seja significativa, trata-se de uma indução baixa, de apenas 15%. O tratamento com DL_{50%} de ACNU (29 μ M), no tempo de 24h, aumenta os níveis de γ H2AX, que é acompanhado pelos mesmos níveis de γ H2AX induzidos pelo pré-co-tratamento. Porém, no tempo de 72 h, enquanto a DL_{50%} de ACNU (37 μ M) e Ly294002 induz níveis altíssimos de γ H2AX (55%), o tratamento com a DL_{50%} de ACNU mantém os níveis de γ H2AX perto dos níveis relativos ao tempo de 24 h (entre 15 a 20%). No tempo de 144 h, os níveis γ H2AX induzidos por ambos os tratamentos retornam a níveis mais baixos (mas ainda maiores que o controle não-tratado), indicando claramente uma remoção dos danos, especialmente dos danos causados pelo pré-co-tratamento.

Em relação à linhagem XP-A, **Figura 17B**, podemos observar que não existem diferenças entre o controle não-tratado e com o tratamento com Ly294002, assim como não ocorre uma indução de γ H2AX no tempo de 24 h, independentemente do tratamento estabelecido (ACNU= 30 μ M e ACNU+ Ly294002= 11,9 μ M). No período de 72 h, no entanto, o tratamento com ACNU induz significativamente os níveis do marcador (15%), enquanto o pré-co-tratamento induz para níveis de aproximadamente 30%. No período de 144h, os níveis de γ H2AX já retornam aos níveis basais.

Na **Figura 17C**, correspondente à linhagem XP-V, observamos, assim como na linhagem MRC5, que os níveis de γ H2AX induzidos por Ly294002 também é aumentado em relação ao controle-negativo. Porém, ao contrário da linhagem proficiente (MRC5), na linhagem XP-V, já no tempo de 24 h, ocorre uma grande indução de γ H2AX quando tratada com a DL_{50%} de ACNU (7 μ M) (40%), superada pelo pré-co-tratamento (7 μ M) (60%). No tempo de 72 h, porém, observamos uma mudança no fenótipo analisado: enquanto os níveis de γ H2AX diminuem com o tratamento da DL_{50%} de ACNU (25%), os níveis de γ H2AX aumentam com o pré-co-tratamento (70%) em relação ao tempo de 24 h. No tempo de 144 h, os níveis de γ H2AX de ambos os tratamentos caem (9% com DL_{50%} de ACNU e 45% com DL_{50%} de ACNU e Ly294002), mas ainda permanecem discrepantes entre si, demonstrando uma persistência das lesões induzidas pelo pré-co-tratamento.

Figura 17. Cinética de indução de γ H₂AX (% da intensidade média de γ H₂AX/célula)- frente ao tratamento com LD₅₀ de ACNU ou LD₅₀ de ACNU + Ly294002 (1 μ M), por citometria de fluxo. **A.** MRC5 ACNU (LD₅₀ = 29 μ M) ou ACNU (LD₅₀= 37 μ M) + Ly294002 (1 μ M). **B.** XP-A - ACNU (LD₅₀=30 μ M) ou ACNU (LD₅₀=11,19 μ M) + Ly294002 (1 μ M) **C.** XP-V- ACNU (LD₅₀ = 7 μ M) ou ACNU (LD₅₀ = 7 μ M) + Ly294002 (1 μ M). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada.

4.8 Perfil diferencial da capacidade de reparo de células humanas de plasmídeos tratados com ACNU

Com o intuito de verificar se precisamente a capacidade de reparo das linhagens mutantes é o que interfere na sensibilidade ao ACNU, nós realizamos o teste de Reativação do Gene Repórter (“*Host Cell Reactivation*”). Para tanto, as células foram transfectadas com dois plasmídeos contendo genes repórteres: pShuttle/Luc e pShuttle/RL. O plasmídeo pShuttle/Luc foi tratado com 3, 10, 100 e 300 μ M de ACNU, enquanto o pShuttle/RL foi utilizado para normalização dos resultados. A leitura da fluorescência relativa à reativação do gene da luciferase foi realizada 96 h

após o tratamento/ transfecção. Estes estudos permitem avaliar o reparo das lesões, ou a recuperação da transcrição gênica, em condições nas quais as células não foram submetidas ao tratamento com o agente genotóxico.

Na **Figura 18A**, as linhagens utilizadas foram as linhagens tumorais de glioma, duas delas selvagens para *TP53* (U87MG e U343MG) e duas linhagens mutadas para *TP53* (U138MG e U251MG). Pode-se observar que já nas doses mais baixas (3 e 10 μ M), ocorre um rápido decaimento na capacidade de reparo das linhagens mutadas para *TP53*. Doses a partir de 50 μ M já induzem uma clara diferenciação entre a capacidade de reparo das linhagens mutadas para *TP53* (<60%) e das linhagens proficientes em *TP53*, que mantém níveis acima de 70%.

Na **Figura 18B**, utilizamos as linhagens deficientes em NER (XP-A e XP-C) e em TLS (XP-V), além da linhagem controle, selvagem, MRC5. Podemos observar que a linhagem MRC5 é totalmente proficiente no reparo das lesões induzidas pelo ACNU, mantendo os níveis da sua capacidade de reparo em torno de 90%. Já as linhagens deficientes em NER, sofrem um rápido declínio na sua capacidade de reparo, mesmo em doses mais baixas. Para doses a partir de 50 μ M, elas também apresentam a capacidade de reparo reduzida para níveis inferiores à 60%.

Por outro lado, a linhagem deficiente em TLS, XP-V, embora atinja os mesmos níveis de capacidade de reparo de XP-A e XP-C para as maiores doses, apresenta uma curva de decaimento mais amena, com níveis de 80% e 65% para as doses intermediárias de 30 e 100 μ M, respectivamente (**Figura 18B**).

O conjunto desses dados demonstra que as linhagens tumorais diferem-se drasticamente na sua capacidade de reparo dependendo do status de *TP53*, sendo que as linhagens mutadas têm sua capacidade de reparo das lesões induzidas por ACNU comprometidas; e que tanto as linhagens portadoras de mutações em NER ou em TLS também não podem lidar de maneira satisfatória na remoção dos danos causados por ACNU.

Figura 18. Medida da atividade de reparo (HCR) após o tratamento com diferentes doses de ACNU.

A. U87MG (p53wt), U343MG (p53wt), U251MG (p53wt) e U138MG (p53mt). **B.** MRC5, XP12BE(XP-A), XP44PA(XP-C) e XP30RO(XP-V). Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada. As curvas de tendência representam o *Best-Fit* ($p < 0,05$).

4.9 Perfil diferencial da capacidade de reparo de ICLs de células de glioma p53wt e p53mt

Assim como a maioria dos quimioterápicos existentes atualmente, o ACNU também não é capaz de gerar um único tipo de lesão. Além dos ICLs, o ACNU é capaz de gerar uma variedade de monoadutos e ligações cruzadas entre cadeias (ICLs). Para averiguar a importância dos ICLs na dinâmica de reparo das células de gliomas, as células U87MG (p53wt) e U251MG (p53mt) foram submetidas ao teste modificado de cometa SCGE, no qual o encurtamento da cauda do cometa é proporcional ao número de ICLs formados. Desta forma, para este teste, nós mantivemos controles não-tratados, controles apenas irradiados (8 Gy de radiação γ), controles tratados com ACNU (100 μM) e as amostras teste, irradiadas e tratadas com ACNU. O delineamento experimental abrangeu uma cinética de 120 h.

Assim como a maioria dos quimioterápicos existentes atualmente, o ACNU também não é capaz de gerar um único tipo de lesão. Além dos ICLs, o ACNU é capaz de gerar uma variedade de monoadutos e ICLs. Para averiguar a importância dos ICLs na dinâmica de reparo das células de gliomas, as células U87MG (p53wt) e U251MG (p53mt) foram submetidas ao teste modificado de cometa, no qual o encurtamento da cauda do cometa é proporcional ao número de ICLs formados. Desta forma, para este teste, nós mantivemos controles não-tratados, controles apenas irradiados (8 Gy de radiação γ), controles tratados com ACNU (100 μM) e as

amostras teste, irradiadas e tratadas com ACNU. O delineamento experimental abrangeu uma cinética de 120 h.

Como podemos observar na **Figura 19A**, os controles da linhagem U87MG (p53wt) comportaram-se da seguinte forma: células não tratadas apresentam baixos níveis de quebras (TM de aproximadamente 32) que, como esperado, aumentam após irradiação γ . Células tratadas com ACNU também apresentaram níveis baixos de TM, em todos os tempos amostrados, demonstrando que apenas o tratamento com ACNU não induz quebras no DNA, independentemente do tempo de tratamento. Por outro lado, as amostras tratadas e irradiadas apresentam uma dinâmica bem diferente. Nas primeiras 48 h de tratamento existe uma tendência das células sobreviventes, em comparação com o controle Irradiado, de diminuição do TM, que se torna mínimo no tempo de 72 h (TM-14). Esses dados indicam que a indução de ICLs nessas células não é rápida, apresentando sua máxima em 72 h de tratamento. Nos tempos seguintes (96 e 120 h), ocorre uma recuperação do nível de quebras em relação à amostra apenas irradiada, indicando a ocorrência de reparo gradual e tardio de ICLs.

Já na **Figura 19B**, relativa à linhagem U251MG (p53mt) pode-se observar também que os controles estavam de acordo com o esperado de cada um, pois as células não tratadas apresentam baixos níveis de quebras (TM próximos de zero), as células irradiadas altos níveis (TM-40) e as células tratadas apenas com ACNU também apresentam níveis baixos de TM, em todos os tempos amostrados. Porém, o perfil da linhagem mutada em *TP53* quando irradiada e tratada com ACNU mostra-se bem diferente da linhagem proficiente em *TP53*: enquanto nestas o declínio nos níveis do TM é seguido de sua recuperação nos tempos mais tardios (96 e 120 h), na linhagem U251MG observa-se um acentuado declínio dos níveis de quebras, até o tempo de 96 h amostrado (TM) atinge níveis inferiores a 10. No tempo de 120 h, as células sobreviventes já apresentam uma completa remoção dos ICLs restantes.

Estes dados sugerem que na linhagem U87MG, a formação máxima de ICLs se dá no tempo de 72 h e que esta linhagem é apta a remover os ICLs induzidos, ao contrário da linhagem U251MG, que não consegue recuperar os níveis de TM comparáveis ao controle irradiado. Acreditamos que a rápida recuperação no tempo de 120 h dessas células indique uma seleção de células sobreviventes ao tratamento que foram capazes de reparar os ICLs.

Figura 19. Teste do cometa adaptado para detecção de ICLs em gliomas. As células foram tratadas com ACNU, recolhidas em diferentes tempos e irradiadas com 8 Gy de radiação γ . Controles não- tratados e não- irradiados também foram incluídos. **A.** U87MG (p53wt); **B.** U251MG (p53wt). Resultados obtidos de três experimentos independentes.

Para testar a importância da lesão de ICLs em células deficientes em NER, nós utilizamos também as linhagens MRC5 e XP-C. Desta forma, para este teste, nós utilizamos controles não- tratados, controles apenas irradiados (8 Gy de radiação γ), controles tratados com ACNU (100 μ M) e as amostras teste, irradiadas e tratadas com ACNU. O delineamento experimental abrangeu uma cinética de 120 h.

Como podemos observar na **Figura 20**, verificamos que os controles, tanto na linhagem proficiente (MRC5) (**Figura 20A**), quanto na mutada para XPC (**Figura 20B**), comportaram-se como o esperado, sendo que o controle não tratado e não irradiado não induz um aumento na cauda dos cometas, o controle irradiado, por produzir muitas quebras, induz um aumento substancial no nível de quebras, e o controle tratado com ACNU induz apenas um pequeno aumento do TM.

Porém, tanto para as linhagens proficiente e mutada (**Figuras 20A e B**), as amostras teste irradiadas e tratadas com ACNU- exibem inicialmente (24 e 48h), baixos níveis de TM quando comparadas com o controle irradiado. No entanto, embora esses níveis sejam baixos, apresentam uma tendência de aumento e a partir do ponto de 72 até 120 h, já alcançam os mesmos níveis do controle irradiado.

Esses dados demonstram que ambas as células, MRC5 e XP-C, apresentam capacidade de reparo dos ICLs formados a partir do tratamento com ACNU.

Figura 20. Teste do cometa adaptado para detecção de ICLs em fibroblastos humanos. As células foram tratadas com ACNU, recolhidas em diferentes tempos e irradiadas com 8 Gy de radiação γ . Controles não- tratados e não- irradiados também foram incluídos. **A.** MRC5; **B.** XP-C. Resultados obtidos de nove experimentos independentes.

4.11 Sensibilização de células de glioma ao tratamento com ACNU pelo silenciamento gênico de NER

Devido à sensibilidade observada das linhagens mutadas em NER ao agente cloroetilante ACNU, decidimos investigar a relevância desta via na resistência das células de glioma a este agente, lançando uma nova perspectiva em relação as vias de reparo de DNA envolvidas na quimiorresistência de GBMs.

Desta forma, nos utilizamos da tecnologia de RNA interferência (RNAi) para o silenciamento de duas proteínas de NER (XPC e XPF) nas células U87MG (p53wt). O *knockdown*, obtido com uma concentração de 20 nM de cada siRNA após 48 h da transfecção, como pode ser observado na **Figura 21A**. O WB para verificação da expressão de XPF ainda necessita ser realizado, uma vez que não encontramos anticorpos que tivessem funcionado para essas células. Os parâmetros observados foram obtidos através do teste de Anexina-V-PI por citometria de fluxo e os níveis de apoptose, necrose e morte celular induzida analisados. As células foram silenciadas com siXPC e siXPF, além da transfecção de uma sequência aleatória sem alvo definido, denominada *scramble* (Scr) para controle experimental. Neste caso, porém, utilizamos uma dose de 10 nM de cada siRNA devido à toxicidade apresentada pelo siScr. As células foram tratadas com 100 μ M de ACNU, subtraídas da indução da morte celular basal de cada siRNA e comparadas em relação à sequência *scramble*.

Os dados obtidos mostram que os controles, tanto o controle não-transfectado quanto siScr induzem níveis basais de morte celular. O silenciamento de *XPC* em U87MG induz baixos níveis de morte celular, inferiores a 10% (**Figura 21B**). Porém, diante do tratamento com ACNU, as células silenciadas para *XPC* apresentam um nível de morte celular induzido de aproximadamente 20% (**Figura 21C**), aumentando significativamente a sensibilidade de U87MG ao ACNU. Além disso, a maior contribuição para os níveis de morte total se dá pela via apoptótica.

O silenciamento de *XPF* em células de glioma induz, por si só, uma pequena toxicidade, de aproximadamente 12% (**Figura 21B**). Porém, em relação a morte celular induzida, verificamos que o silenciamento de *XPF* aumenta ainda mais a sensibilidade de U87MG em relação ao ACNU, superiores a 20% (**Figura 21C**). Novamente, a morte celular por apoptose nessas células foi o evento que contribuiu mais para a sensibilização, em relação à necrose.

Esses dados demonstram claramente que a via de NER é importante na remoção das lesões induzidas pelo ACNU em gliomas.

Figura 21. Efeito do silenciamento gênico de NER em glioma a sensibilidade ao ACNU. **A.** *Knockdown* das proteínas XPC e XPF por siRNA em U87MG (p53wt), por WB. **B.** Toxicidade de células U87MG silenciadas para a via de NER (XPC e XPF), diante do tratamento com 100 μM de ACNU, valores absolutos das percentagens de eventos apoptóticos e necróticos. **C.** Morte Celular Induzida (Morte Celular após tratamento com ACNU menos a morte do seu respectivo controle). Resultados obtidos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.12 Expressão diferencial de TLS Pols em GBMs e tecidos cerebrais normais

Conforme os resultados obtidos nos experimentos anteriores, a linhagem XP-V apresentou não só uma grande sensibilidade ao agente quimioterápico ACNU, como também altos níveis de γ H2AX, indicando que TLS pode ter participação na resistência de tumores à esta droga. Por esta razão, nós decidimos verificar em amostras de tecido normal de cérebros humanos e em amostras de tecidos cerebrais classificados como GBM a frequência de duas proteínas relacionadas à TLS: POLH e POLK.

Na **Figura 22A** podemos verificar os géis ilustrativos contendo as amostras supra mencionadas, revelando a frequência das bandas relativas à presença da proteína POLK

(superior), POLH (meio) e do controle de corrida (β -actina, inferior). Na **Figura 22B**, um resumo em uma tabela de contingência das frequências de cada proteína (POLH ou POLK) tanto nas amostras de tecido normal quanto de GBMs. Nela, podemos identificar as seguintes frequências: 0 em 4 amostras de tecido cerebral normal expressam POLK, enquanto 5 em 10 amostras de GBMs expressam essa proteína; e 2 em 4 amostras de tecido cerebral normal expressam POLH, enquanto 6 em 10 amostras de GBMs fazem o mesmo.

Aplicando-se o teste de χ^2 , verificamos que a proporção de POLH é significativamente diferente entre as amostras de tecidos cerebrais normais e GBMs, o que também ocorre em relação à frequência de POLK entre essas duas amostras. Ainda, numa segunda análise, podemos verificar que existe diferença significativa entre as frequências da expressão de POLH e POLK em ambos os tecidos, de modo geral.

Esses resultados mostram que existe uma maior frequência na expressão das proteínas TLS POLH e POLK nos GBMs quando comparados aos tecidos normais, sendo POLH ainda mais frequente que POLK.

Figura 22. Expressão protéica de enzimas TLS em tecidos de cérebro normal e tecidos de GBM, por WB. **A.** POLK, POLH e β - actina.; **B.** Tabela de contingência (Teste de χ^2 , * $p < 0,05$). Resultados obtidos de três experimentos independentes.

4.13 Indução de resposta aos danos no DNA por ACNU em células de glioma silenciadas para TLS Pols

Com o intuito de verificar se a expressão de duas das proteínas de TLS – POLH e POLK - são capazes de interferir na capacidade de respostas aos danos no DNA das células de glioma (U87MG (p53wt)), nós utilizamos a tecnologia do silenciamento de RNA (siRNA). Desta forma, utilizamos 20 nM de siPOLH ou 20 nM de siPOLK, além do controle de transfecção – 20 nM de siScr. As células foram silenciadas para essas proteínas, tratadas com 50 μ M de ACNU e, 48 h depois, submetidas à detecção do número de foci de γ H2AX e 53BP1 formados, através de microscopia de imunofluorescência.

Na **Figura 23A**, podemos ver as imagens ilustrativas relativas a cada um dos tratamentos e, nelas, quantidades representativas dos foci de γ H2AX (em verde), 53BP1 (em vermelho) e dos foci de co-localização (em branco-amarelado). Os núcleos são visualizados em azul. Na **Figura 23B**, temos a quantificação obtida a partir da contagem do número de foci/células das imagens obtidas no LSM. Podemos verificar na **Figura 23B** que tanto o controle negativo quanto a transfecção realizada com siScr, siPOLH e si POLK, induzem níveis mínimos, próximos de zero, de qualquer tipo de foci. O tratamento com ACNU, porém, gera um número médio de foci significativamente maior que o controle negativo (uma mediana de 30 foci/célula). O tratamento das células de glioma com siScr e ACNU aumentam ligeiramente o número de foci de 53BP1 quando comparado ao tratamento com ACNU apenas (aproximadamente 35 foci/célula) e tanto o silenciamento de *POLH* quanto *POLK* mais o tratamento com ACNU aumentam significativamente o número de foci de 53BP1, γ H2AX e da co-localização destes (50 e 60 foci/célula, respectivamente) em relação ao controle local, siScr mais ACNU.

Esses dados demonstram que o silenciamento de proteínas ligadas ao TLS – neste caso POLH e POLK, em células de glioma, são capazes de induzir as respostas ligadas ao dano no DNA quando tratadas com ACNU.

Figura 23. Indução de resposta aos danos no DNA em células U87MG (p53wt) silenciadas para TLS, por imunofluorescência. **A.** Fotos representativas da indução dos foci de γ H2AX (verde), 53BP1 (vermelho) e sua co-localização (branco-amarelado) e do núcleo (azul). **B.** Quantificação do número de foci γ H2AX, 53BP1 e sua co-localização por célula. Resultados obtidos de dois experimentos independentes.

Devido à sensibilidade observada da linhagem mutada em *POLH* ao agente ACNU, ao aumento diferencial nas respostas ao dano no DNA em células silenciadas para *POLH* e *POLK* e à expressão diferencial dessas proteínas em GBMs em relação aos tecidos cerebrais normais, nós também decidimos investigar a relevância da via de TLS na resistência das células de glioma a este agente, na tentativa de entender a tolerância de danos na quimiorresistência de GBMs.

Desta forma, nos utilizamos da técnica de RNAi e silenciaremos duas proteínas de TLS (POLH e POLK) nas células U87MG (p53wt). O silenciamento gênico de *POLH* e *POLK*, obtido a partir do *knockdown* com 20 nM dos siRNAs, após 48 h da transfecção, pode ser observado nos WBs mostrados nas **Figuras 24A e B**, respectivamente. Os parâmetros observados foram obtidos através do teste de Anexina-V-PI por citometria de fluxo e os níveis de apoptose, necrose e morte celular induzida analisados. Porém, devido à alta toxicidade do siScr na dose de 20 nM, utilizamos a dose de 10 nM para cada siRNA utilizado, para a análise desses parâmetros. As células foram tratadas com 100 μ M de ACNU, subtraídas da indução da morte celular basal de cada siRNA e comparadas em relação à sequência *scramble*.

Os dados obtidos, em concordância com os dados anteriores obtidos por diferentes métodos, mostram que U87MG é bastante resistente ao ACNU, sendo que a dose de 100 μ M induz níveis de morte celular inferiores a 20% (**Figura 24C**). Os dados também demonstram que o silenciamento de *POLH* e *POLK* em U87MG induzem baixos níveis de morte celular, inferiores a 10% (**Figura 24C**). Porém, diante do tratamento com ACNU, as células silenciadas para *POLH* apresentam um nível de morte celular induzido de aproximadamente 30% (**Figura 24D**), aumentando significativamente a sensibilidade de U87MG ao ACNU. Além disso, a via apoptótica é a via que mais contribui para os níveis de morte total.

O silenciamento de *POLK* em células de glioma induz, por si só, níveis mínimos de toxicidade, inferiores a 10% (**Figura 24C**). Porém, em relação a morte celular induzida, verificamos que o silenciamento de *POLK* não é capaz de aumentar significativamente a sensibilidade de U87MG em relação ao ACNU (**Figura 24D**). Pelo contrário, este silenciamento parece ter uma tendência em proteger essas células frente ao tratamento.

Esses dados demonstram claramente que a via de TLS, especialmente *POLH* mas não *POLK*, é importante na tolerância das lesões induzidas pelo ACNU em gliomas.

Figura 24. Efeito do silenciamento gênico de TLS Pols em células de glioma tratadas com ACNU. **A. e B.** *Knockdown* das proteínas POLH e POLK por siRNA em U87MG (p53wt), por WB. **C.** Toxicidade de células U87MG silenciadas para a via de TLS (POLH e POLK), diante do tratamento com 100 μM de ACNU, valores absolutos das percentagens de eventos apoptóticos e necróticos. **D.** Morte Celular Induzida (Morte Celular após tratamento com ACNU menos a morte do seu respectivo controle). Resultados obtidos de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

4.15 Investigação da participação de NER e TLS na citotoxicidade induzida por TMZ

A droga TMZ é um agente alquilante que atua pela metilação das bases do DNA, sendo a lesão mais frequente, mutagênica e responsável pela indução da morte celular a metilação da Guanina. Depois de observar que linhagens deficientes em NER e POLH são mais sensíveis que as linhagens proficientes frente às lesões induzidas pelo agente alquilante ACNU- que induz monoadutos e ICLs- nós decidimos verificar o envolvimento de NER e TLS frente às lesões induzidas pelo agente alquilante TMZ.

O parâmetro analisado foi o de indução de Sub-G1, 144 h após o tratamento, para todas as linhagens. Na **Figura 15A** pode-se observar que as linhagens XP-A e XP-C apresentam os mesmos níveis de indução de apoptose que a linhagem MRC5, com uma indução máxima de aproximadamente 25% na dose mais alta, de 50 μ M. Apenas na dose intermediária, de 20 μ M, a linhagem XP-C parece mais resistente que XP-A ou MRC5. Na **Figura 15B**, por outro lado, observamos que tanto C5RO e XP-F apresentam níveis mínimos de indução de apoptose por TMZ, que não chega a 10% para ambas as linhagens.

Porém, na **Figura 15A**, podemos observar que a linhagem mutada em *POLH* (XP-V) é relativamente sensível ao agente metilante quando comparada com MRC5, apresentando níveis de morte de 30% já nas doses mais baixas, de 5 μ M.

Esses dados indicam que NER não participa do reparo das lesões induzidas por TMZ e que *POLH* pode ter um papel importante na tolerância às lesões induzidas por este agente.

Figura 25. Indução de apoptose pelo tratamento com TMZ em diferentes linhagens mutadas em NER ou TLS. As amostras foram coletadas 144 h após o tratamento e seu conteúdo Sub-G1 analisado por citometria de fluxo **A**. MRC5, XP-A, XP-C e XP-V, 144 h após o tratamento. **B**. C5RO e XP-F. Resultados obtidos de três experimentos independentes em triplicada. As curvas de tendência representam o *Best-Fit*

5 DISCUSSÃO

Todos os tipos de cânceres são complexos e o GBM não é uma exceção. No entanto, o prognóstico extremamente pobre, que compromete rapidamente a qualidade de vida dos pacientes, as opções de tratamentos muito limitadas e a sobrevida baixíssima destes tornam imperativos que a comunidade científica se preocupe em desvendar a patofisiologia desta doença: Os melhores resultados na sobrevida destes pacientes alcançam apenas 14,6 meses de sobrevivência mediana. A infiltração do tecido normal pelas células tumorais representa uma grande dificuldade na ressecção cirúrgica e explica parcialmente a baixa sobrevida dos pacientes. Além disso, a diversidade de genótipos que contribuem para fenótipos histologicamente heterogêneos são características adicionais deste tipo tumoral que oferecem grandes obstáculos para uma terapia efetiva.

A base molecular da heterogeneidade dos gliomas foi evidenciada em estudos nos quais se constatarem uma grande diferença no cariótipo de células isoladas a partir de espécimes clínicos frescos ou mesmo em culturas celulares estabelecidos, além de uma grande variedade na expressão de marcadores antigênicos.

A introdução de drogas com alvos moleculares é um dos avanços mais significativos na terapia do câncer nas últimas décadas. Terapias alvo bloqueiam a ativação de vias oncogênicas, seja pela inibição de interações receptores-ligantes ou pela inibição da transdução de seus sinais downstream, evitando assim o crescimento e progressão tumoral. Por causa da sua especificidade, terapias-alvo têm, teoricamente, eficácia e segurança melhores do que as terapias citotóxicas sistêmicas sozinhas.

Com o recente progresso no entendimento da composição genética e molecular de GBMs, novas drogas candidatas à terapia têm surgido. Em particular, drogas anti-angiogênicas têm contribuído, ainda que de forma modesta, no controle da doença. Também, os elementos da família de PI3K tornaram-se fortes candidatos ao desenvolvimento de pequenas moléculas inibitórias. Porém, o maior desafio no tratamento de GBM, que é o fato de que esses tumores invariavelmente se tornam refratários ou resistentes ao tratamento, permanece.

Assim, novas pesquisas translacionais são cruciais, no sentido de contribuir de forma lógica para o desenho do tratamento, para o desenvolvimento de biomarcadores da atividade das drogas e para elucidar seus mecanismos de resistência. Muitos estudos já identificaram os mecanismos de reparo preferenciais induzidos por TMZ. Em relação ao ACNU, no entanto, devido à complexidade das lesões induzidas por este quimioterápico, os estudos são bem mais escassos e os mecanismos de reparo provavelmente diferentes de TMZ. Talvez, como uma forma de saturar os mecanismos de reparo da célula e contornar a quimiorresistência, a utilização de um regime terapêutico alternado entre ambas as drogas fosse capaz de aumentar a sobrevida dos

pacientes. Com esses objetivos em vista, este trabalho teve como foco investigar os efeitos da droga ACNU em células humanas e as vias de reparo de DNA potencialmente envolvidas na remoção dos danos causados por ela, contribuindo, por isso, para a resistência de gliomas.

Anteriormente, Batista e colaboradores (BATISTA et al., 2007) demonstraram que as células de glioma morrem preferencialmente pela via apoptótica, após o tratamento com ACNU e BCNU. Neste sentido, os autores do trabalho apontaram uma diferença entre células p53wt e p53mt: em células proficientes para *TP53*, tanto a via extrínseca (resultado demonstrado pela ativação da caspase-8 e pelo efeito da transfecção de um vetor DN- FADD, que bloqueia os receptores de morte) quanto a via intrínseca (resultado demonstrado pela degradação de BCL-2, pela regulação positiva de BAX e ativação da caspase 9) são ativadas. Por outro lado, em células mutantes para *TP53*, apenas a via intrínseca (mostrada pela falta de ativação da caspase-8 e o efeito de DN-FADD) mostrou-se envolvida na morte celular por apoptose disparada por ACNU.

Os autores também demonstraram que células de glioma p53wt são mais resistentes às CENUs que p53mt. Esses dados tiveram implicações profundas, pois sugerem um mecanismo diferencial de sensibilidade a esses agentes, dependendo do status de *TP53*. Neste contexto, outros achados importantes foram a indução de DSBs e o aumento da indução gênica de dois genes reparo após o tratamento com ACNU: *XPC* e *DDB2*.

De fato, o tratamento com CENUs e a indução de quebras no DNA parecem fatos correlacionados. No trabalho de Moralez-Ramirez (MORALES-RAMIREZ; VALLARINO-KELLY; CRUZ-VALLEJO, 2010), eles determinaram a cinética de formação de micronúcleos na medula óssea de murinos. Micronúcleos (MNs) são corpos extra-nucleares que contém fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo durante a divisão celular. O tamanho do micronúcleo é proporcional ao seu conteúdo e, em caso de fragmentos cromossômicos, indicam a presença de agentes capazes de gerar quebras no DNA. Neste sentido, os autores demonstraram que a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN- PCE) encontra-se aumentada in vivo após o tratamento com bis-cloroetilnitrosourea, quando comparada aos controles. Adicionalmente, verificou-se que a formação dos MNs induzidos por esse agente se dava no terceiro ciclo da divisão celular (MORALES-RAMIREZ et al., 2004).

A indução de quebras por ACNU também foi evidenciada após o tratamento com ACNU, pela co-localização de foci de γ H2AX e 53BP1 em células CHO (“*Chinese Hamster Ovary cells*”) sincronizadas (NIKOLOVA et al., 2012).

Como anteriormente descrito, a indução de DSBs pode ser reparada tanto por HRR ou NHEJ. NHEJ é o principal processo em mamíferos e ocorre durante todas as fases do ciclo celular. Em células de mamíferos, HRR usa predominantemente uma cromátide irmã como molde, o que restringe a ação HR às fases S/G2. Como ambos mecanismos podem atuar na fase

G2 do ciclo celular, a escolha da via de reparo que entrará em ação não é trivial e implica a necessidade de uma regulação em vários níveis para assegurar um equilíbrio entre elas, garantindo o reparo acurado e apropriado para o contexto celular (KAKAROUGKAS; JEGGO, 2014).

Alguns autores propõem que NHEJ é a via preferencial também em G2, reparando 80% das DSBs induzidas por raios-X. Porém, uma pequena percentagem está sujeita à ressecção das extremidades e reparo por HR. A troca de NHEJ por HR se dá por um reposicionamento de 53BP1 na periferia do foci induzido, num processo dependente de BRCA1. Assim, acredita-se que a via de NHEJ é preferencialmente utilizada em relação a HR por ser um processo mais compacto que não necessita grandes rearranjos da cromatina na vizinhança da quebra (KAKAROUGKAS; JEGGO, 2014; TAKAHASHI et al., 2014).

A fosforilação das proteínas de reparo de DSBs por CDKs é essencial para que a via de HR se restrinja a S/G2. Em vertebrados, CtlP é dependente de ATM para localizar-se no dano e a sua regulação no ciclo celular se dá tanto por uma ativação de CtlP pela fosforilação dependente de CDKs, quanto por uma restrição da ação dessa proteína nas fases S/G2. Assim, os níveis de CtlP são baixos em G1, mas reguladas positivamente durante a progressão por S/G2. Além disso, a fosforilação dependente de CDK da Ser327 de CtlP promove a formação de um complexo com MRN e BRCA1 em S/G2. A ligação de MRN permite o arranjo necessário pelo qual CtlP é tanto alvo de CDK quanto protegida da proteólise (YUN; HIOM, 2009).

Devido às evidências de que as CENUs induzem DSBs, nossa primeira pergunta sobre os mecanismos de reparo envolvidos na remoção das lesões induzidas por ACNU foi se NHEJ estaria de alguma forma relacionada à proteção da célula ao tratamento com esse agente.

Para respondermos a esta questão, utilizamos a droga Ly294002 para bloquear a via de NHEJ, através de uma inibição de DNA-PK. A droga Ly294002 foi o primeiro inibidor sintético desenvolvido a partir da molécula de quercetin e é considerado um inibidor relativamente inespecífico da via de PI3K. Seu principal alvo são as moléculas pertencentes à classe IV de PI3k, que apresentam um núcleo catalítico, mas não apresentam atividade de lipídeo quinase. As moléculas desta classe são, portanto, mTOR e DNA-PK, além de CK2. Ly294002 é capaz de atuar na inibição do crescimento celular e tem reconhecida atividade antitumoral dependentes da dose. Apesar disso, Ly294002 falhou em entrar em estudos clínicos devido aos efeitos colaterais tóxicos na pele, atribuídos a indução da apoptose, além de sua baixa solubilidade e baixa biodistribuição. Porém, Ly294002 tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de estudo desta via, tendo contribuído enormemente para o entendimento da função de PI3K. Seu modo de ação se dá através de uma ligação reversível no sítio catalítico da subunidade DNA-PKcs e a especificidade em relação à molécula inibida depende da dose. Por isso, utilizamos esta droga em concentrações sub-tóxicas, a fim de minimizar seus efeitos inespecíficos. O pré-co-

tratamento com o inibidor foi definido para garantir uma inibição mais prolongada da via (BERRIE, 2001; KNIGHT, 2010; KONG; YAMORI, 2008; STEIN, 2001).

Quando as células de glioma U87MG (p53wt, PTENmt), U343MG (p53wt, PTENwt), U251MG (p53mt, PTENmt) e U138MG (p53mt, PTENwt) foram pré-co-tratadas com Ly294002 e ACNU, os resultados obtidos indicaram que a inibição de DNA-PK não induz qualquer diferença na viabilidade dessas células ao tratamento com ACNU. Para mais uma confirmação deste resultado, utilizamos o inibidor Nu2076 em células LN229 (p53wt, PTENwt), um inibidor que é pelo menos cinco vezes mais seletivo para DNA-PKcs em relação a outras proteínas da família PI3K, como ATM e ATR (NUTLEY et al., 2005). Ainda assim, a inibição de DNA-PKcs por NU2076 não foi capaz de afetar a viabilidade celular frente ao tratamento com ACNU (**Figura 11**).

Analisando-se a capacidade de indução de apoptose nas células de glioma, constata-se que também não há qualquer diferença entre os níveis induzidos pelo pré-co-tratamento entre Ly294002 e ACNU em relação aos níveis induzidos somente pelo ACNU (**Figura 12**). Esse conjunto de dados revela que provavelmente NHEJ não é a via preferencial de reparo das lesões induzidas pelo quimioterápico, independentemente de TP53 ou de PTEN.

Esses resultados são corroborados pelos achados anteriores de Nikolova e colegas, que verificaram que células de CHO mutadas para *DNA-PK* são resistentes ao ACNU. Por outro lado, esses autores também demonstraram que, enquanto as células mutadas em DNA-PKcs mostraram-se resistentes ao ACNU, as células mutadas em *KU80* são moderadamente sensíveis. Os autores atribuem essa diferença à capacidade de *KU80* em recrutar BRCA1 aos sítios de DSB (NIKOLOVA et al., 2012). Assim, como BRCA1 é um mediador da função de HR, através de RAD51, a falta de *KU80* deve ter um impacto também em HR, nas forquilha de replicação bloqueadas, evidenciando um possível papel no *cross talk* entre HR e NHEJ.

Também é possível concluir que, enquanto *TP53* induz uma resposta diferencial entre linhagens selvagens e mutadas, *PTEN* não parece ser um marcador preditivo ao tratamento com ACNU. Esse dado é bastante curioso, uma vez que as mutações em *PTEN* estão entre as mais importantes em GBMs primários (30%) e secundários (10%), tendo sido proposto como alvo tanto para a diferenciação dos subtipos moleculares de GBMs quanto para a terapia.

De fato, alguns trabalhos sugerem a importância de *PTEN* nestes aspectos: a expressão do cDNA de PTENwt em células de glioma com alelos endógenos de PTENmt suprime a proliferação delas, enquanto a mesma expressão em células de glioma com um *background* selvagem para este gene não tem nenhuma alteração na proliferação celular (FURNARI et al., 1997). Adicionalmente, a transferência gênica mediada por adenovírus de MMAC1/PTEN suprime a capacidade tumorigênica de U87MG in vivo e a super-expressão de PTEN em células de glioma interfere na migração, disseminação e formação de adesões focais, sugerindo que a

ação de supressão tumoral mediada por ele se dê pelo menos no nível de regulação negativa com a matriz extracelular (CHENEY et al., 1998; TAMURA et al., 1999).

Por outro lado, Wick e colegas (WICK et al., 1999) mostraram que a transferência gênica de *PTEN* diminui o crescimento celular- sem interferir com a apoptose - e que a sua expressão ectópica em células de glioma não altera a sensibilidade aos quimioterápicos vicristina, cytarabina, cisplatina e BCNU. Nesse trabalho, *PTEN* exógeno somente foi capaz de sensibilizar as células de glioma à radiação ionizante e à apoptose induzida por CD95L.

Sabe-se que a radiação ionizante é um poderoso indutor de morte celular por apoptose e que CD95L (FasL) é um indutor de apoptose pela via extrínseca. Relembrando, o trabalho de Batista et al (2007) demonstra que células de glioma p53wt tratadas com ACNU são capazes de induzir apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, enquanto p53mt apenas pela via intrínseca. Nossos resultados demonstram que o status de *PTEN* não sensibiliza as células de glioma ao tratamento com ACNU, nem por uma maior perda da viabilidade celular, nem por um aumento da indução da apoptose. Racionalizando conjuntamente todos esses dados, é possível cogitar que PTEN esteja muito mais relacionado com as respostas celulares de crescimento e adaptação ao meio extracelular do que qualquer interferência com as atividades de reparo e regulação da apoptose.

Nos perguntamos, então, quais outras vias poderiam estar envolvidas no reparo das lesões induzidas pelo ACNU. A segunda pista foi seguir os passos deixados por Batista et al, que demonstraram que *XPC* e *DDB2* estavam induzidos em células de glioma proficientes em *TP53* (U87MG), mesmo embora todos os outros genes de reparo testados por eles, tanto da via de GGR-NER quanto de TCR-NER, não estivessem induzidos. Da mesma forma, tendo em mente o mecanismo de ação do ACNU – que se dá pela formação de ICLs – decidimos testar também a participação de POLH na tolerância a essas lesões.

Para responder a esta pergunta, nós primeiramente avaliamos a viabilidade celular de XP-A e XP-F, que participam tanto de GGR quanto de TCR, e de XP-V. Os dados obtidos demonstraram que essas linhagens celulares são significativamente mais sensíveis que as linhagens controles (**Figura 13 A e B**), implicando numa possível participação da via de NER e de TLS.

Desta forma, verificamos também se essa sensibilidade poderia ser atribuída à um aumento da morte celular por apoptose (**Figura 13 C e D**). Os dados obtidos demonstram que XP-A, XP-C, XP-F e XP-V apresentam níveis de apoptose significativamente mais elevados que as linhagens controles (MRC5 e C5RO). Estes dados nos indicam, então, que muito provavelmente as vias de NER e TLS estão implicadas na capacidade das células lidar com os danos causados por esta droga.

Dado que a deficiência em NER ou POLH afeta diretamente a viabilidade celular e a tolerância das lesões induzidas por ACNU, testamos também se, neste contexto, a deficiência em

NHEJ poderia ter algum efeito diante do tratamento com este quimioterápico. Surpreendentemente, os dados demonstram que apenas a linhagem XP-A sofre uma pequena sensibilização devido ao pré-co-tratamento com Ly294002. Já nas linhagens XP-F e XP-V, não se observa qualquer efeito – seja aditivo ou sinérgico- diante do pré-co-tratamento (**Figura 14**).

Esses dados poderiam indicar que, na ausência de XP-A- um componente central da via de NER- poderia ocorrer um acúmulo de lesões não reparadas que se converteriam em quebras, levando a uma saturação da via de HR, obrigando a célula a recorrer a outros mecanismos de reparo.

Com esta hipótese em mente, decidimos investigar os fenótipos celulares envolvidos na resposta ao tratamento com ACNU e ao pré-co-tratamento com Ly294002 e ACNU. Escolhemos testar, nestas análises, as linhagens XP-A, por ter apresentado sensibilização, e XP-V, por não ter apresentado sensibilização e não pertencer à via de NER, além da linhagem controle MRC5, obviamente.

A análise do ciclo celular dessas linhagens (**Figura 15**) mostra um mesmo padrão diante do tratamento equitóxico com ACNU: esta droga induz uma parada bastante proeminente em todas as linhagens celulares, na fase S do ciclo celular. Nas linhagens MRC5 e XP-A, a fase S é o momento em que esta parada é mais expressiva, até o tempo de 96 h, quando as células conseguem progredir para G2. Para XP-V, no entanto, embora a parada em S seja levemente menos expressiva, é mais persistente, até o tempo de 144 h.

Quando comparamos, no entanto, o pré-co-tratamento de Ly294002 e ACNU, percebemos uma mudança no comportamento celular: para as três linhagens analisadas: MRC5 apresenta, já com 24 h de tratamento, um forte bloqueio em G2/M, que se estende até 96 h. Em XP-A, ocorre uma diminuição na proporção de células em S e um acúmulo de células em G2/M e para XP-V, uma diminuição mais sutil em S e aumento da proporção de G2, até os tempos mais tardios. De modo geral, pode-se concluir que a perda da função de PI3K, acreditamos, DNA-PK, leva a uma perda do controle da parada do ciclo celular em S, permitindo as células a evadirem-se para G2/M.

Diante do fenótipo apresentado, testamos a hipótese de que os tratamentos definidos induzissem um maior número de quebras no DNA celular. Assim, observamos o nível de γ H2AX nessas mesmas linhagens, por citometria de fluxo.

A estrutura da cromatina controla a execução de várias transações relacionadas ao DNA, como a replicação, transcrição, recombinação e reparo. Um código de histonas define os diferentes estados da cromatina. A histona H2AX é uma forma variante de H2A, encontrada em quase todos eucariotos. Ela contribui de forma importante para a estabilidade genômica por seu papel na sinalização de danos ao DNA, agindo como um alicerce na montagem do foci de

reparo. H2AX torna-se rapidamente fosforilada (γ H2AX) em sítios de DSBs e cobre amplas regiões cromossômicas adjacentes a cada quebra. Assume-se que γ H2AX represente uma forma de identificação de DSBs (Pinto e Flaus, 2010).

A histona variante H2AX é uma componente chave da DDR. Em ratos, a perda de H2AX leva à instabilidade genômica. Ratos H2AX $-/-$ são sensíveis à radiação, apresentam retardo do crescimento e apresentam problemas de imunidade. A haploinsuficiência de H2AX compromete a integridade genética e, na ausência de *TP53* aumenta a susceptibilidade ao câncer (CELESTE et al., 2003).

Pode-se verificar (**Figura 17**) que o tratamento de MRC5 e XP-A com doses equitóxicas de ACNU foi capaz de induzir um aumento significativo γ H2AX, porém em níveis máximos que não ultrapassaram 20% e em ambos os casos, os níveis de γ H2AX já mostraram-se normais após 144 h. Por outro lado, o pré-co-tratamento com Ly294002 e ACNU, no tempo de 72 h, tanto em MRC5 quanto XP-A, induziu uma diferença significativa no nível de H2AX fosforilado em relação ao tratamento com ACNU sozinho, elevando as taxas deste marcador para níveis de 55 e 30%, respectivamente.

Por outro lado, a linhagem deficiente em TLS (XP-V) apresentou níveis mais elevados após o tratamento com ACNU – aproximadamente 40% logo nas primeiras 24h - que foi suscedido por um decréscimo até 144 h, voltando aos níveis normais. Já o pré-co-tratamento com Ly294002 e ACNU foi capaz de induzir uma diferença significativa em relação ao tratamento com ACNU em todos os tempos amostrados, com níveis de γ H2AX acima de 50%, em todos eles.

Em radiobiologia, é largamente aceito que o número de DSBs correlaciona-se com o número de foci de γ H2AX numa proporção de 1:1. Além disso, a cinética de desaparecimento dos foci assemelha-se claramente à cinética de reparo de DSB, para baixos níveis de danos. Esse fato parece explicar o decaimento, para as linhagens MRC5 e XP-A, dos níveis de γ H2AX no tempo de 144 h, quando as células já morreram ou se livraram do dano devido ao reparo (BOUQUET; MULLER; SALLES, 2006).

Num estudo da validade de γ H2AX como um biomarcador de genotoxicidade, (NIKOLOVA et al., 2014) compararam 14 agentes genotóxicos bem conhecidos com 10 drogas não-genotóxicas. A quantidade de foci de γ H2AX foi determinada por imunohistoquímica e citometria de fluxo. Os autores demonstraram, entre outros aspectos, que todos os agentes genotóxicos testados foram capazes de induzir γ H2AX de forma dependente da dose, enquanto os agentes não-genotóxicos não foram capazes de induzi-la; que os dados obtidos a partir da contagem dos foci e por citometria de fluxo são altamente correlacionados e ainda que os foci de

γ H2AX estavam colocalizados com 53BP1 e Rad51, dando suporte à conclusão de que eles representam, verdadeiramente, DSBs.

In vivo, a formação de foci de γ H2AX induzido por radiação ionizante em células estacionárias depende da ação redundante de duas proteínas quinases: ATM e DNA-PK. ATM é atraída aos sítios de DSBs pelo complexo RAD50-MRE11-NBS1 e DNA-PK é provavelmente atraída pela proteína de ligação às extremidades Ku. Depois de formada, γ H2AX recruta a proteína mediadora MDC1, que recruta complexos Rad50 e ATM adicionais para amplificação do sinal e indução do espalhamento de fosforilação de H2AX por algumas megabases próximas a cada dupla quebra. Como os tamanhos dos foci de γ H2AX são variáveis, a extensão desta fosforilação deve ser afetada por outros fatores, como por exemplo, a taxa de religação das DSBs, a densidade da cromatina, a atividade transcricional ou reparo de lesões do tipo simples-quebras que estejam próximas às duplas quebras (STIFF et al., 2004).

Curiosamente, as três linhagens testadas tiveram maior indução de γ H2AX após o pré-co-tratamento de ACNU e Ly294002. Assumimos, com o respaldo da literatura, que Ly294002 tem, dentro da família PI3K, apenas mTOR, CK2 e DNA-PK como alvos (BRUNN et al., 1996; GHARBI et al., 2007). Se isso é verdade, uma possível explicação para o aumento de γ H2AX em todas as linhagens pré-co-tratadas com o inibidor e ACNU em relação ao tratamento apenas com ACNU se daria: *i*) pela atividade normal de ATM na fosforilação de H2AX; e *ii*) na menor taxa de religação das duplas quebras devido à inibição de DNA-PK; Isso também explicaria o dano persistente – até 144 h – em XP-V no pré-co tratamento.

No entanto, conjugando o fenótipo do ciclo celular com o de indução de quebras, poderíamos deduzir que embora a atividade de ATM seja normal na fosforilação de H2AX, talvez com a inibição de DNA-PK (que também é importante na fosforilação de ATM) a propagação do sinal não seja totalmente suficiente para a sinalização celular e consequente parada em S, como observamos apenas com o tratamento com ACNU, em todas as linhagens.

Desta forma, o trabalho caminhou no sentido de tentarmos elucidar o mecanismo responsável pela diferença encontrada nas entre células de glioma sensíveis e resistentes ao ACNU, e os mecanismos responsáveis pela maior sensibilidade, maior indução de apoptose, além dos fenômenos observados no ciclo celular e na indução de γ H2AX dos fibroblastos com diferenças mutações na via de NER e TLS.

A resistência de células tumorais a um tratamento pode ser intrínseca ou adquirida, e é um reflexo de inúmeros eventos de alterações genéticas e epigenéticas. As drogas anticancerígenas comumente têm o DNA como alvo. Desta forma, podemos facilmente enxergar que a primeira característica da droga deve ser a sua capacidade de penetrar a barreira representada pela membrana celular, que deve trabalhar como a primeira linha de defesa e resistência das células a

diversos tipos de drogas. Alguns carreadores específicos transportam ativamente algumas drogas pela membrana, e a resistência a elas pode ser gerada por uma redução da afinidade do carreador à droga ou por uma diminuição da velocidade do transporte. Ainda, por uma capacidade da célula de detoxificar a droga, ou por uma capacidade aumentada de secretar a droga antes que esta atinja seu alvo, através de mecanismos de afluxo, sendo este último considerado o principal evento responsável pelo fenótipo de MDR (NIERO et al., 2014).

Além desses mecanismos, a resistência adquirida pode se dar pela exposição contínua às drogas, que podem disparar diferentes respostas celulares, como o bloqueio das vias apoptóticas, mudanças nos pontos do controle celular, indução gênica e capacidade aumentada de reparo do DNA.

Como podemos observar na **Tabela 1**, as linhagens tumorais utilizadas neste trabalho apresentam diferentes *backgrounds* genéticos, que poderiam levar essas células a apresentarem mecanismos de resistência ao ACNU bem distintos. Optamos por investigar, então, a capacidade de reparo nas células de glioma diretamente pela ação em plasmídeo tratado exogenamente.

O ensaio de HCR é uma técnica utilizada para mensurar a capacidade de reparo de uma célula frente a uma lesão em DNA exógeno. Neste método, a célula hospedeira é transfectada com um plasmídeo tratado, contendo um gene repórter que foi desativado devido às lesões causadas por agentes genotóxicos. A habilidade de uma célula reparar as lesões no plasmídeo transfectados permite que o gene repórter seja reativado, resultando na sua expressão, tradução e atividade protéica do produto gênico, que pode ser quantificado.

Já foi mencionado, anteriormente, que células de glioma mutadas para TP53 são mais sensíveis ao ACNU. Pode-se observar, na **Figura 18**, que as linhagens p53mt também apresentam menor capacidade de reparar as lesões induzidas por esta droga quando comparadas com as linhagens p53wt através de HCR. Esses dados indicam o mecanismo diferencial pelo qual TP53 possibilita que as células de glioma sobrevivam às lesões induzidas por este quimioterápico, demonstrando que o tratamento com ACNU, cujo alvo é a molécula de DNA, é, por princípio, menos eficaz na terapia de pacientes que apresentem TP53 proficiente.

Os dados obtidos também mostram que todas as células mutadas testadas, XP-A, XP-C e XP-V, tiveram um comprometimento da capacidade de reparo em relação à célula proficiente (MRC5). XP-A e XP-C, no entanto, apresentaram menor capacidade de reparo em relação ao controle. De fato, esses dados podem ser respaldados pela identificação, em outros trabalhos, da maior indução da expressão gênica de *XPC* (e *DDB2*) em células de glioma p53wt após o tratamento com ACNU e permitem-nos concluir que a via de NER atua diretamente no reparo das lesões induzidas por este agente, como indicado naquele trabalho (BATISTA et al., 2007).

XP-V, embora em doses menores não tenha o nível de HCR tão comprometido quanto XP-A ou XP-C, também difere-se significativamente do controle. Esse dado é surpreendente,

uma vez que o experimento é realizado com a transfecção de um plasmídeo não replicativo, o que sugere que POLH- uma polimerase translesão- com uma atividade dissociada da forquilha de replicação! E permite-nos cogitar que a participação de POLH na tolerância das lesões induzidas por ACNU se dê não só através do mecanismo de replicação da lesão, pelo qual é conhecida, mas levanta a possibilidade de que atue também, neste caso, por preenchimentos de lacunas (“*gap filling*”) referentes ao reparo das lesões; ou como participante da via de HR, como sugerido por outros autores (SEBESTA et al., 2013)

Confrontando esses dados da capacidade de reparo com os dados de sobrevivência e indução da apoptose nas células estudadas (**Figura 13**), podemos verificar que dentre essas linhagens, XP-V é a mais sensível frente ao tratamento com ACNU. Este resultado poderia estar possivelmente relacionado ao fato de que a resposta ao tratamento de uma célula com um agente quimioterapêutico envolve a coordenação de vários eventos simultâneos que não só o reparo da lesão *per se*. Embora tanto a resposta celular ao tratamento com um plasmídeo contendo lesões específicas, quanto a resposta celular ao tratamento direto com o agente indutor dependam de uma fisiologia apropriada da célula, esta última exige de maneira muito mais acentuada a regulação de outros fatores como o ajuste da progressão do ciclo, capacidade de regulação da expressão gênica de proteínas e enzimas e de reações intra ou extracelulares que podem afetar as atividades celulares, por não apresentar suas estruturas intactas.

Visto que a droga TMZ é uma droga bastante utilizada na quimioterapia para GBMs e que compartilha com ACNU algumas características interessantes, por ser também um agente alquilante cujo principal alvo é a posição O6 da Guanina, nós nos interessamos em investigar se NER e TLS poderiam participar também da remoção das lesões induzidas por TMZ.

Desta forma, optamos por verificar diretamente o nível de indução de apoptose estimulado por este quimioterápico (**Figura 25**). Curiosamente, as linhagens celulares mutadas em NER – XP-C, XP-A e XP-F – não apresentaram qualquer diferença em relação às linhagens controles MRC5 e C5RO. Por outro lado, XP-V mostrou-se significativamente mais sensível que o controle, embora os níveis induzidos sejam apenas de uma grandeza intermediária.

Neste sentido, nossos resultados obtidos a partir de fibroblastos humanos imortalizados apontam para o caminho em que as vias de NER ou TLS (leia-se, pela falta de POLH), são necessárias para o reparo das lesões induzidas por ACNU, sejam elas monoadutos ou ICLs. Porém, tem sido exaustivamente demonstrado que a lesão responsável pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos de ACNU é a O6-cletG, que é convertida em um ICL. Da mesma forma, inúmeras evidências também demonstram que o efeito citotóxico e genotóxico de TMZ é devido a lesão O6-meG. Essas conclusões foram elaboradas a partir de experimentos em que a expressão de MGMT, que é uma enzima específica para remoção de alquilações na posição O6-G, abole completamente esses efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade diante do tratamento com essas

drogas (BECKER et al., 2003; BECKER; THOMAS; KAINA, 2014; EICH et al., 2010; EICH et al., 2013; KNIZHNIK et al., 2013; QUIROS; ROOS; KAINA, 2011; ROOS et al., 2009).

De fato, as drogas citostáticas ou carcinogênicas cujo mecanismo de ação se dá pela alquilação do DNA podem induzir diferentes tipos de lesões. Em células que não expressam MGMT ou que a expressam em baixos níveis, O6-alquilG é a lesão mais genotóxica, recombinogênica e citotóxica e, no caso de O6-meG, a genotoxicidade e citotoxicidade depende da atividade de MMR (BECKER et al., 2003; GROMBACHER; EICHHORN; KAINA, 1998; KAINA; AURICH, 1984; KAINA; CHRISTMANN, 2002; KAINA; FRITZ; COQUERELLE, 1993; KAINA; HEINDORFF; AURICH, 1983; LIPS; KAINA, 2001; MITRA; KAINA, 1993; KAINA; MARGISON; CHRISTMANN, 2010; PREUSS; THUST; KAINA, 1996; ROOS et al., 2007). Já em células expressando MGMT em altos níveis ou diante do tratamento com agentes alquilantes que produzem poucas quantidades de O6-alquilG, as N-alquilações tornam-se as principais lesões genotóxicas. No caso das metilações, estas são reparadas pela via de BER que, como sabemos, lida com lesões menores, como sítios AP, bases oxidadas, entre outras (WIRTZ et al., 2010).

A resistência observada das células mutadas em NER diante do tratamento com TMZ indicam que NER provavelmente não participa da remoção das lesões do tipo O6-meG. Como anteriormente mencionado, a via de NER está envolvida no reconhecimento e reparo de lesões que causam uma grande distorção na dupla-hélice do DNA. Nossos dados sugerem, assim, que possivelmente as lesões do tipo O6-meG, ao contrário das lesões do tipo O6-cletG, não são grandes e distorcíveis o suficiente para ativar esta via de reparo.

Desta forma, diante dos nossos resultados e do conhecimento teórico disponível, é razoável inferir que NER e TLS provavelmente participam no reparo das lesões O6-cletG induzidos por ACNU, mas que, por outro lado, NER não está envolvido no reparo das lesões O6-metilG induzidas por TMZ.

Os ICLs formados a partir de O6-cletG induzidos por ACNU, são estruturas que ligam covalentemente duas bases em fitas opostas da hélice do DNA, constituindo lesões extremamente citotóxicas, por prevenir a separação das duas fitas do DNA, inibindo a replicação e transcrição (HLAVIN et al., 2010). Essas estruturas são produtos comuns dos agentes alquilantes bifuncionais, sendo consideradas as principais lesões que desencadeiam as respostas celulares a este tipo de tratamento.

Em mamíferos, é reconhecido que a via de FA é responsável pela cascata de sinalização do dano e promoção do reparo de ICLs. Muito pouco se sabe, porém, sobre a participação de *TP53* na regulação do reparo dessas lesões. Num estudo conduzido por Martinez e colaboradores (MARTINEZ et al., 2008), verificou-se que células linfoblásticas do grupo de complementação FA-A apresentam um aumento significativo de aberrações cromossômicas após o tratamento

com MMC e que o dano induzido por esta droga é correlacionado com um aumento geral da expressão dos genes relacionados à DDR modulados por TP53. Os genes induzidos, em geral, estavam relacionados à atividade *downstream* de TP53 na prevenção da morte celular e de danos cromossômicos, mas não no controle da parada do ciclo celular ou DSBs.

Assim, decidimos verificar o quanto a presença ou ausência de *TP53* era capaz de interferir na atividade de reparo dos ICLs formados pelo tratamento com ACNU. Nos experimentos de cinética de remoção de ICLs, é importante observar que somente a fração viva (ou as células aderentes) foram analisadas. E células com fenótipos característicos de corpos apoptóticos vistos nas lâminas, não foram contabilizados.

Na análise da cinética de remoção dos ICLs (**Figura 19**), nossos resultados indicam que a linhagem proficiente em *TP53* (U87MG) é capaz de reparar os ICLs e que o reparo completo é obtido no período de 120h. Já a linhagem deficiente em *TP53* (U251MG), possui uma capacidade de remoção significativamente menor nos tempos de 72 e 96 h. Essa capacidade de remoção de ICLs está em concordância com os dados obtidos através do HCR, no qual observamos que as linhagens p53mt tem menor capacidade de reparo geral. De fato, *TP53* pode, neste contexto, ser importante na regulação das atividades de reparo do ICL, como sugerido por Martinez et al 2008. Em 144 h, a pequena fração de células sobreviventes ao tratamento foram capazes de resolver o dano.

Várias vias de reparo têm sido implicadas no reparo de ICLs, mas o mecanismo molecular preciso é ainda desconhecido. Em *E. coli* e *S. cerevisiae*, NER é responsável pela liberação do aduto de uma das fitas do DNA. Após a sua liberação, os ICLs podem ser reparados por um evento de HR, quando uma fita molde não danificada está disponível. Adicionalmente, um evento independente da recombinação pode ocorrer quando este molde não está disponível. Este mecanismo passível de erros parece utilizar a síntese translesão para fazer o *bypass* do aduto remanescente, sendo um evento importante em células que não estão em divisão ou estão na fase G1 do ciclo celular (LEHOCZKY; MCHUGH; CHOVANEC, 2007; WENG et al., 2010).

Em mamíferos, porém, a participação de NER na remoção de ICLs induzidos por diferentes agentes permanece, até o momento, controversa. De Silva e colegas, trabalhando com células CHO, demonstrou que mutantes defectivos em HR (*XRCC2* e *XRCC3*) são altamente sensíveis à mustarda nitrogenada (HN2). Por outro lado, as linhagens celulares mutadas em NER testadas (*XPB*, *XPD* e *XPG*), além da linhagem mutada em NHEJ (*XRCC5-KU80*), mostraram-se minimamente sensíveis. Mutantes em *XPF* e *ERCC1*, que participam tanto da via de NER quanto de FA, mostraram-se altamente sensíveis, colocando em cheque a participação da via de NER propriamente dita na remoção dos ICLs derivados de HN2. Neste caso, os autores ainda confirmaram que apenas ERCC1-XPF eram necessários para a etapa do desenganchamento do

ICL, sendo que os outros mutantes analisados, *XRCC2*, *XRCC3* e *XRCC5* apresentaram uma cinética normal nesta etapa do reparo (DE SILVA et al., 2000).

Como se observa na maioria dos trabalhos, esses autores também encontraram uma indução de DSBs diante do tratamento com este agente formador de ICLs e demonstraram (DE SILVA et al., 2000) que tanto a formação quanto o reparo dessas lesões (DSBs) encontraram-se normais em todas as células mutadas em NER, incluindo *ERCC1* e *XPF*. *XRCC2*, *XRCC3* (de HR) e *XRCC5* (de NHEJ), embora apresentassem uma cinética normal de indução de DSBs, para *XRCC2* e *XRCC3* observou-se que essas linhagens estavam seriamente comprometidas no reparo de DSBs. Os autores concluíram, assim, que apenas *ERCC1-XPF* teriam um papel no reparo de ICLs pela excisão dos mesmos, mas não na etapa recombinacional do reparo dessas lesões. E, além disso, que HR, mas não NHEJ, seriam importantes no reparo das DSBs induzidas pelo tratamento com HN2 (BESSHO; MU; SANCAR, 1997).

Estes dados relativos à via de NER não parecem ser corroborados pelos dados de Bessho e colegas, que demonstraram, *in vitro*, num experimento muito elegante de reconstituição proteica com extratos de células de mamíferos, que somente com todo aparato protéico de NER e ATP é possível observar a remoção de um oligo de aproximadamente 22 a 24nt de um substrato contendo um único ICL de psoraleno, ou um oligo de 23 a 29nt de um substrato contendo um único monoaduto deste mesmo agente. Neste e em outros experimentos, os autores demonstram que a falta de qualquer componente de NER torna a excisão e o reparo do substrato contendo as lesões impraticáveis (BESSHO; MU; SANCAR, 1997).

Quando decidimos verificar a influência de NER na capacidade de reparo de ICLs pelo teste de cometa, escolhemos trabalhar com a linhagem XP-C, além da linhagem controle. Esta escolha se deu baseada não só no papel de XPC em NER, de reconhecimento da lesão, mas também pelas evidências acumuladas relativas à sua sensibilidade, menor capacidade de reparo (HCR) e indução gênica após tratamento com ACNU (**Figura 18**). Nossos resultados indicaram, porém, que não houve diferença na cinética de remoção dos ICLs em células XP-C, em relação à MRC5 (**Figura 20**).

Esse resultado primeiramente nos causou estranhamento. Por quê células mutadas em XPC, sensíveis e com capacidade de reparo geral reduzida, não apresenta uma capacidade de reparo de ICLs comprometida?

Após nos confrontarmos diuturnamente com esta questão e buscarmos na literatura evidências que nos ajudassem a entender esta característica, hipotetizamos que: *i*:- embora comumente os ICLs sejam considerados como uma classe única de tipo de danos, eles são estruturalmente diversos e por isso as células podem requerer mecanismos celulares distintos para se livrarem dessas lesões. Por exemplo, a distância entre as bases ligadas por ICL interfere no grau de distorção no DNA induzido pelo ICL, interferindo, assim, com as proteínas capazes de

realizar o seu reconhecimento e o seu *bypass*. XP-C poderia, desta forma, não apresentar um fenótipo deficiente para o reparo dos ICLs induzidos por ACNU por sua mutação não impedir completamente o reconhecimento desta lesão específica, o que justificaria um fenótipo mais ameno da sensibilidade de XP-C quando comparada com XP-A ou XP-F. Ainda, XPC pode não ser, simplesmente, o fator limitante nesta cascata de reparo. Ou, de outra forma, poderia haver uma concorrência com outras proteínas que pudessem reconhecer e sinalizar este dano, uma etapa do reparo de ICLs que não dependesse exclusivamente da atividade de XPC. Esta hipótese é razoável nos seguintes sentidos: primeiro, em células que estão ativamente se replicando, a maior parte dos danos é reconhecida e sinalizada pelo bloqueio da forquilha de replicação seguida por FA, que se encarrega de coordenar as proteínas efetoras do reparo. Segundo, para alguns tipos de lesões, DDB2 (XPE), ou às vezes até XPA podem ser suficientes para o reconhecimento e recrutamento de todo aparato *downstream* de NER (TAKEDACHI; SAIJO; TANAKA, 2010).

Estas hipóteses podem ser exemplificadas por diversos trabalhos, que demonstraram que tanto os complexos XPC-RAD23B e XPA-RPA são capazes de se ligar a ICLs induzidos por psoraleno *in vitro* (THOMA et al., 2005). Eles também demonstraram que a capacidade de reparo deste tipo de ICLs estava reduzida em extratos proteicos de células deficientes em *MSH2*, demonstrando que as células deficientes nesta proteína são também hipersensíveis ao psoraleno fotoativado. Porém, nesse trabalho, a mutagênese induzida manteve os mesmos níveis das células proficientes, indicando que o papel da proteína *MSH2* de MMR estaria envolvida numa etapa do reparo de ICLs livre de erros. Posteriormente, o grupo demonstrou que o complexo MutS β atua no reconhecimento do ICL de psoraleno em células de mamíferos, interagindo com XPC-RAD23B e XPA-RPA de uma forma dependente da concentração dessas proteínas: enquanto XPA-RPA interage com MutS β mesmo em baixas concentrações, XPC-RAD-23B o faz apenas quando em altas concentrações. Assim, conclui-se que tanto as proteínas das vias de NER e de MMR atuam no reconhecimento dos ICLs formados por psoraleno (ZHAO et al., 2009).

Por outro lado, outros estudos demonstraram que a capacidade de reparo de ICLs induzidos por MMC, medida por HCR, em células mutadas em *XPC* era a mesma que nas células proficientes. No entanto, células mutadas em *XPA* apresentaram menor capacidade de reparo dessas lesões e estavam envolvidas no reconhecimento inicial do ICL de MMC (AHN et al., 2004).

Desta forma, embora nossos dados não indiquem que XP-C tenha qualquer comprometimento em sua capacidade de reparo dos ICLs, não podemos excluir a participação dos outros elementos da via de NER. Ainda, não podemos excluir a possibilidade de que a sensibilidade moderada de XP-C se deva às lesões secundárias- os monoadutos- também induzidos pelo agente cloroetilante ACNU; comparativamente, células silenciadas ou inibidas para BER (responsável pela remoção dos monoadutos induzidos por agentes metilantes)

apresentam-se mais sensíveis a esses agentes, em mais uma indicação que a lesão primariamente responsável pela toxicidade deles é a O6-alquilG (WIRTZ et al., 2010).

Assim, para checarmos a relevância clínica potencial que esta via poderia ter, decidimos silenciar através de siRNA, os genes XPC e XPF em células de glioma proficientes em TP53 (U87MG), ou seja, com capacidade de indução de XPC e que são, também, extremamente resistentes ao ACNU (**Figura 21**).

De fato, a importância de NER vai além do fenótipo apresentado por pacientes XP. De Feraudy e colaboradores (DE FERAUDY et al., 2010) concluíram que a perda ou a mutação de XPC deve ser um evento precoce na carcinogênese da pele, promovendo uma vantagem seletiva na iniciação e progressão de carcinomas de células escamosas de pacientes não portadores de XP-C. Essas conclusões foram obtidas a partir da observação, entre outros experimentos, por imunohistoquímica, na qual a expressão de XPC estava inativada ou perdida em metade dos casos de carcinoma de células escamosas de pacientes não comprometidos por XP.

Berndt e colegas (BERNDT et al., 2006) verificaram a existência de 22 polimorfismos de um único nucleotídeo em 11 genes de NER em 250 casos de câncer colorretal. A variante *ERCC6* (CSB) 1213G, que conhecidamente diminui a capacidade de NER, foi associada com um aumento no risco de câncer colorretal quando comparado com homozigotos wt. Adicionalmente, a presença de pelo menos um alelo *XPC* 492H também está associado ao aumento do risco deste tipo de câncer e, quando o efeito combinado dos polimorfismos destes dois genes foi analisado, o risco é significativamente aumentado. Esses dados permitiram concluir que mesmo polimorfismos em *ERCC6* e *XPC* podem estar associados com um risco aumentado de câncer colorretal.

Hollander e colaboradores (HOLLANDER et al., 2005) demonstraram que os genes *XPC* e *GADD45a* estão envolvidos na iniciação e progressão de tumores de pulmão e que 100% dos camundongos *XPC*^{-/-} desenvolvem tumores de pulmão espontaneamente, com uma minoria progredindo para carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC- “*Non Small Cell Lung Adenocarcinoma*”). Também, numa análise retrospectiva, verificaram a perda alélica de *XPC* na maioria dos casos deste tipo de câncer.

A hipermetilação de *XPC* foi encontrada em 4 de 5 linhagens celulares de câncer de pulmão que apresentam mutações em *TP53*, mas não é observada em linhagens celulares com p53wt. Para verificar se a inativação de *XPC* está envolvida na ocorrência de mutações em *TP53*, Wu e colaboradores silenciaram *XPC*, por RNAi, em células A549 e então trataram com benzo[a]pireno por diferentes passagens (WU et al., 2007). Os dados obtidos permitiram concluir que mutações do tipo G -> T no códon 215 de *TP53* foram encontradas nas células silenciadas para *XPC*. Esses dados sugerem que a hipermetilação do gene *XPC* promove a sua inativação, que pode contribuir para a ocorrência de mutações em *TP53* durante a tumorigênese.

Defeitos em *XPC* também estão associados a outros tipos de tumores sólidos. O mecanismo pelo qual esses defeitos podem contribuir para a progressão tumoral, porém, ainda não está clara. Estudos mostram que existe uma alta correlação entre a progressão do câncer na bexiga urinária e uma expressão atenuada da proteína *XPC*. Além disso, neste trabalho também verificou-se uma alta correlação entre a deficiência de *XPC*, mutações em *TP53* e o grau de malignidade do tumor. Quando linhagens celulares de tumores de bexiga com baixa expressão de *XPC* são transfectadas com um vetor de expressão do cDNA de *XPC*, verifica-se que as células tornam-se mais sensíveis à cisplatina, além de terem a expressão de *TP53* e *P73* aumentadas (CHEN et al., 2007; DAI et al., 2013; DAI et al., 2014; QIAO et al., 2011). Yang e colaboradores também verificaram que o gene *XPC* estava hipermetilado na maioria dos casos de câncer de bexiga, quando comparado com a mucosa normal (YANG et al., 2005; YANG et al., 2010).

Em relação a *XPF*, no entanto, existe uma clara convergência da literatura para a conclusão de que esta é uma endonuclease que atua na incisão e, consequentemente, na etapa de desenganchamento de ICLs. Certas mutações em *XPF* podem inclusive levar ao fenótipo de FA, sem qualquer fenótipo XP presente. Nestes casos, o paciente é referido como pertencente ao grupo de complementação FA-Q (BOGLIOLO et al., 2013).

Recentemente, novas funções têm sido atribuídas ao complexo ERCC1-XPF. A primeira delas sugere que ERCC1-XPF é importante para a correta finalização de HR, conclusão obtida a partir da observação de que foci de RAD51 são induzidos por cisplatina ou MMC independentemente de ERCC1. Porém a HR induzida por MMC é defeituosa no plasmídeo repórter em células defectivas para ERCC1. Outros autores sugerem que ERCC1 e XPF são necessárias no processamento das DSBs induzidas pelos ICLs, de modo que esses intermediários citotóxicos (DSBs) possam ser reparados por HR (AL-MINAWI et al., 2009).

Adicionalmente, têm-se observado que ERCC1-XPF pode promover não só uma clivagem a 5' da lesão, como ocorre na via de NER, mas em ambos os lados da lesão. Este relato foi obtido utilizando-se oligonucleotídeos contendo um único ICL de psoraleno. Outros trabalhos, utilizando-se de oligonucleotídeos contendo um ICL de psoraleno numa junção de 3 vias (DNA em forma de Y, que mimetiza uma forquilha de replicação bloqueada), demonstraram também que ERCC1-XPF é capaz de promover uma incisão a 5' da lesão (de maneira dependente da forma do DNA) e também uma incisão específica do lado 3' do ICL, resultando no desenganchamento do ICL e introduzindo uma DSB na forquilha de replicação (FISHER; BESSHO; BESSHO, 2008).

Sob outro ponto de vista, polimorfismos de *ERCC1-XPF* estão correlacionados com gliomas, cânceres de NSCLC, câncer colorretal, gástrico, de mama e de testículos. Particularmente, foi demonstrado que a cura de tumores de testículos, 80% deles são remissíveis mediante o tratamento com cisplatina, se deve à hipersensibilidade desses tipos celulares à

cisplatina, pela baixa expressão de XPF nestes tecidos (KOBBERLE et al., 2010; USANOVA et al., 2010; SHI et al., 2012).

Nossos resultados (**Figura 21**) indicaram que o silenciamento, tanto de *XPC* quanto de *XPF*, são capazes de sensibilizar significativamente as células de glioma ao ACNU, levantando essas duas proteínas como alvos potenciais na terapia de gliomas e aumentando as evidências de que a via de NER é capaz de proteger essas células frente às lesões de ACNU, por participar do reparo dessas.

E quanto à relevância clínica potencial e participação de TLS nas respostas ao dano no DNA induzidos por ACNU em gliomas?

Voltando o nosso olhar para os resultados obtidos com TLS, no qual XP-V mostrou-se sensível e com capacidade de reparo reduzida das lesões induzidas por ACNU, decidimos estender a nossa análise de TLS e verificar uma possível participação, não só de POLH, mas também de POLK. Isso porque a ativação aberrante de TLS pode ter uma participação importante na tumorigênese, pela promoção de mutações genéticas (HOFFMANN; CAZAUX, 2010; STALLONS; MCGREGOR, 2010).

Estudos relativos à expressão de POLH e POLK em gliomas e outros tipos tumorais são poucos e divergentes. Pan e colaboradores investigaram a expressão das TLS pols H, K, I, Z em espécimes pareadas não tumorais e em tumores colorretal, de pulmão e estômago. Os pesquisadores identificaram que, exceto para POLH em câncer colorretal, todas essas pols apresentam-se reguladas negativamente nos tecidos tumorais, concluindo que elas provavelmente não estão associadas com o aumento de mutações encontradas nos cânceres humanos (PAN et al., 2005). Em gliomas, encontramos apenas dois trabalhos sobre o tema: Xi e colaboradores verificaram que a expressão de REV3, REV7, POLH e POLI encontra-se significativamente aumentada em espécimes de gliomas de grau II, III e IV, quando comparadas com tecidos cerebrais normais (XI et al., 2009). Adicionalmente, REV1 e POLK encontram-se com a expressão aumentada apenas em gliomas de grau IV, sugerindo que a expressão de TLS pols deve estar associada na potogênese de glioma. Também em relação aos gliomas, Wang e colaboradores investigaram o papel da expressão de POLH, POLK e POLI nesses tumores. Neste estudo, foi verificado que apenas POLK e POLI apresentavam-se superexpressas nas amostras (sem qualquer diferença significativa na expressão de POLH), sendo que a expressão de POLK encontrava-se correlacionada com estágios mais avançados da doença, e POLK e POLI correlacionadas com uma sobrevivência menor dos pacientes (WANG et al., 2010).

Os nossos resultados (**Figura 22**), porém, indicaram um aumento significativo na frequência da expressão tanto de POLH quanto de POLK em gliomas, quando comparados aos tecidos normais de cérebro analisados. Neste ponto, vale ressaltar a dificuldade de obtenção desses espécimes tumorais e, especialmente, dos tecidos normais para controle. As diferenças

encontradas nos diversos estudos podem se dar por: *i*- avaliação de amostras de diferentes populações, com diferentes padrões de expressão. *ii*- diferenças potenciais entre os subtipos moleculares de gliomas das amostras; *iii*- estágio da doença no momento de coleta das amostras; *iv*- histórico do paciente, como, por exemplo, utilização anterior à coleta de quimioterápicos ou radioterapia. No entanto, nossos resultados favorecem a vertente que implica pelo menos POLH e POLK na patogênese dos gliomas.

Para investigar a participação dessas enzimas na resposta do glioma ao tratamento, analisamos seus potenciais em relação à sua influência nas respostas ao dano e na sensibilização deste tipo tumoral.

Nossos resultados indicaram que o silenciamento dos genes de *POLH* e *POLK* aumentam significativamente o número de DSBs, revelado pela presença de foci 53BP1 e γ H2AX (**Figura 23**). Por outro lado, o silenciamento de *POLH*, mas não de *POLK*, é capaz de sensibilizar significativamente as células de glioma ao ACNU (**Figura 24**).

POLK é uma polimerase TLS conhecida por sua habilidade em realizar a síntese translesão de adutos de B[a]P no DNA. Mas também é capaz de fazer o *bypass* de sítios AP, de adutos de acetilaminofluoreno (AAF) e de timina- glicóis. Células tronco embrionárias de camundongos *POLK*^{-/-} são hipersensíveis ao B[a]P, tendo também a sua mutagenicidade aumentada mediante este tratamento. Tanto as células tronco embrionárias quanto os fibroblastos destes camundongos mostram-se também sensíveis à radiação UV (STANCEL et al., 2009; SUZUKI et al., 2001; ZHU et al., 2012). Porém, Ogi e colaboradores demonstraram que o padrão de colocalização de *POLK* com PCNA é bem diferente do padrão de *POLH* com esta mesma proteína, em células não tratadas ou tratadas com diferentes agentes. Adicionalmente, verificou-se que a co-localização de *POLK* com PCNA não depende de *POLH* (OGI; KANNOUCHE; LEHMANN, 2005).

Esse conjunto de dados nos permite concluir que a ausência de *POLK* contribui para uma maior indução de DSBs (em 48 h), embora este fato não reflita em uma real sensibilização das células ao ACNU. Possivelmente, as outras TLS presentes sejam suficientes para completar uma resposta eficaz ao tratamento até o tempo de amostragem nos experimentos de sensibilidade. Por outro lado, a presença de *POLH* mostra-se necessária para uma menor indução de danos e, em consequência, um papel importante na proteção das células de glioma ao tratamento com este agente. Assim, podemos indicar também *POLH*, ou talvez a própria via de TLS, como mais um alvo potencial na terapia de pacientes com gliomas quando tratados com ACNU, por participar da tolerância dessas células a esse agente quimioterápico.

De modo geral, todos os modelos de reparo de ICLs em mamíferos incluem a via de NER e de TLS. Os modelos existentes tentam abordar o reparo dessas lesões em células fora da fase S (ou também chamado de independente da recombinação), no início da fase S ou em

momentos tardios de S (esses, dependentes da recombinação). O ponto chave entre esses modelos é a ocorrência ou não do colapso da forquilha de replicação que encontra o ICL, e se este encontro acontece por uma ou duas forquilhas.

Em células diferenciadas ou que não estejam na fase S (primeiro modelo), acredita-se que haja a atuação de NER, presumivelmente no reconhecimento da lesão (supostamente por XPC, embora os resultados desta etapa sejam conflituosos e apontem para o fato de que, possivelmente, outros fatores estejam envolvidos nesta etapa), mas sabidamente na incisão em ambos os lados do ICL, desenganchando o ICL. Em seguida, pela ausência de uma fita intacta como molde, sugere-se que deva ocorrer um evento de *bypass*, sendo que REV3, REV7 e REV1 têm sido implicadas nesta etapa (SHARMA et al, 2012). Posteriormente, um segundo evento de NER seria necessário, para remoção do aduto remanescente e restauração da fita.

Em células em divisão ativa, quando uma forquilha de replicação encontra um ICL (segundo modelo), ela entra em colapso. A via de FA é rapidamente ativada para evitar o desmonte do replissomo e proteger o DNA lesionado e regiões vizinhas. O evento chave é a incisão na fita molde (*leading*), levando ao desacoplamento do aduto e causando uma DSB. Desta forma, a formação de DSBs é um intermediário obrigatório neste processo de reparo. A incisão em ambos os lados do ICL cria essencialmente um monoaduto numa região de simples fita no cromossomo, que requer um evento de TLS. Uma vez que a dupla-hélice é restaurada, o monoaduto remanescente só pode ser removido por NER ou BER. E, finalmente, o restabelecimento da forquilha só pode ser obtido por HR.

Diversas evidências apontam para este modelo como sendo o mais frequente, como por exemplo, a ativação do *checkpoint* de fase S, que entre outras coisas induz uma diminuição na velocidade de elongação da forquilha e diminui o disparo das origens de replicação (RO). O encontro de duas forquilhas em um mesmo ICL (terceiro modelo), embora abranja as mesmas sequências de evento anteriormente descritas para o reparo, induz duas DSBs e necessita, por isso, de dois eventos de HR.

Baseados no conhecimento obtido na literatura e nos dados deste estudo, propomos um modelo mais específico para o reparo das lesões induzidas por ACNU. Neste modelo (1), o reparo dos monoadutos induzidos pelo agente cloroetilante se daria normalmente pela via de **NER**, devido ao tamanho destas lesões (**Figura 26**). O reparo dos ICLs, por outro lado, em regiões do genoma que não se encontrem em replicação (modelo 2), se daria pela ação sequencial de **NER**, **TLS** e **NER**. No entanto, neste contexto, o reconhecimento inicial do ICL e sinalização da lesão se daria por outros fatores de NER, como DDB2 ou XPA, ou outros fatores desconhecidos, e o aparato *downstream* de XPC seria responsável pelos eventos de incisão e excisão do ICL; sendo **POLH** responsável pelo seu *bypass* (**Figura 27**). Já em regiões do genoma que estivessem ativamente em replicação (modelo 3), onde ocorresse o encontro de uma ou duas

forquilhas de replicação com o ICL, o reparo se daria preferencialmente de forma epistática dependente da **FA**, **NER** e **HR**. Neste sentido, o reconhecimento e sinalização da lesão se daria pela própria via de **FA**, que é conhecidamente necessária para estabilizar a forquilha e o aparato de **NER** (*downstream* a XPC) seria responsável pelos eventos de incisão e desenganchamento do ICL, sendo **POLH** responsável pelo *bypass* subsequente. Em seguida, a DSB gerada pela excisão das fitas na vizinhança da lesão seria reparada por **HR**, levando à restauração das fitas. No entanto, na ausência de **NER**, a deficiência na incisão e excisão do dano levaria a um aumento do número de forquilhas em colapso, numa tendência de aumento no número de DSBs e requerimento de **NHEJ**, numa tentativa da célula de evitar a morte pelo excesso de quebras.

Figura 26. Modelo indicando o reparo de monoadutos induzidos por ACNU pela via de NER. 1 e 2. Reconhecimento da lesão por XPC; 3. Abertura das fitas (pelas helicases XPB e XPD, que compõem TFIIH) e estabilização da fita simples (oposta ao dano); 4. Corte na região 5' ao dano, por XPF-ERCC1; Preenchimento da lacuna pela DNA Pol; 5. Corte na região 3' ao dano, por XPG; Finalização do preenchimento da lacuna; 6. Excisão completa do fragmento contendo o dano. Ligação do novo fragmento por uma DNA-ligase

Figura 27. Modelo indicando o reparo de ICLs induzidos por ACNU pela via de NER e TLS. 1 e 2. Reconhecimento da lesão; 3. Abertura das fitas (pelas helicases XPB e XPD, que compõem TFIIH) e estabilização da fita simples (oposta ao dano); 4. Corte na região 5' ao dano, por XPF-ERCC1; Síntese translesão DE POLH (em lilás); 5. Corte na região 3' ao dano, por XPG; Finalização do preenchimento da lacuna; 6. Desenganchamento do *crosslink* pela excisão completa do fragmento contendo o dano de uma das fitas. Ligação do novo fragmento por uma DNA-ligase; 7. Reconhecimento do aduto contendo o DNA lesado por XPC; 8. Abertura das fitas (pelas helicases XPB e XPD, que compõem TFIIH) e estabilização da fita simples (oposta ao dano); 9. Corte na região 5' ao dano, por XPF-ERCC1; início da síntese de DNA pela DNA POL (em verde); 10. Corte na região 3' ao dano, por XPG; Finalização do preenchimento da lacuna; 6. Excisão completa do fragment de DNA contendo o dano. 11. Ligação do novo fragmento por uma DNA-ligase.

Figura 28. Esquema representativo da via de reparo de ICLs durante a replicação. **1.** Diante de um ICL, a forquilha de replicação fica fisicamente impedida de continuar. Neste momento, Rad18-Rad6 promovem a monoubiquitinação de PCNA, resultando numa troca das polimerases replicativas por TLS Pols. **2.** A via de **FA** é ativada. O heterodímero FancM-FAAP24 é recrutado e evita o colapso da forquilha por um remodelamento da cromatina; FancM associa-se a FancF e/ou a HCLK2, ativando os outros componentes da via por uma transdução de sinal mediada por ATR/CHK1 e levando à formação do Complexo 1. O Complexo 1 é responsável pelo evento chave da via, que é a monoubiquitinação de FancI-FancD2. **3.** FancI-FancD2 associa-se ao complexo, recrutando as proteínas efetoras do reparo propriamente dito. O complexo SLX4 promove o corte envolvendo o ICL; **4.** Tanto o Complexo 1 quanto SLX4 deixam o sítio da lesão e apenas as proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade das fitas e recrutamento do reparo permanecem. **POLH** é recrutada para o *bypass*, **NER** é recrutado para remoção do aduto remanescente e O DSB, provavelmente HR, é recrutado para resolver a quebra. USP1 e UAF1 são responsáveis pela deubiquitinação de FancI-FancD2, regulando negativamente a via. Na ausência de NER ou TLS, ocorre um aumento no número de DSBs, gerando substratos para **NHEJ**.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram concluir que:

- Células de glioma p53wt são mais resistentes que células p53mt devido a uma capacidade de reparo aumentada das lesões induzidas por ACNU, especialmente dos ICLs;
- NHEJ não participa do reparo das lesões induzidas por ACNU, independentemente do status de *TP53* em células de glioma;
- Porém, em um background deficiente em NER, inibidores de NHEJ sensibilizam as células ao agente cloroetilante;
- A via de NER participa do reparo das lesões induzidas por ACNU;
- A via de NER não participa do reparo das lesões induzidas por TMZ;
- POLH é responsável pela TLS de pelo menos algumas lesões induzidas por TMZ;
- XPC, o fator de reconhecimento da via de GGR-NER, não é essencialmente necessário para o reconhecimento dos ICLs induzidos por ACNU;
- TLS, nomeadamente POLH, é responsável pela tolerância das lesões induzidas por ACNU;
- As TLS pols, POLH e POLK encontram-se superexpressas em gliomas, podendo contribuir para a sua tumorigênese;
- O *knockdown* da via de NER, demonstradamente XPC e XPF, sensibilizam as células de glioma p53wt, revelando o potencial destas proteínas (ou desta via) como alvos na terapia adjuvante com ACNU;
- O *knockdown* de POLH, mas não de POLK, sensibilizam as células de glioma p53wt, revelando o potencial dessa enzima (ou de TLS, como um todo) como alvo na terapia adjuvante com ACNU.

7 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste projeto, propomos algumas idéias que poderão ser investigadas:

- I. Verificar a capacidade de reparo de ICLs de XP-A, XP-F e XP-V através do teste de cometa;
- II. Transfectar as células mutadas em NER e *POLH* com um vetor de expressão de MGMT, para verificar a influência específica de cada tipo de lesão induzida por ACNU;
- III. Comparar, através de testes de mutagenicidade, o efeito da inibição de DNA-PK em células mutadas para NER e *POLH*;
- IV. Verificar, através de silenciamento gênico ou do uso de linhagens celulares mutantes, a importância relativa de MMR no reconhecimento das lesões induzidas por ACNU;
- V. Verificar a relação entre *TP53* e *XPC*: por que células com p53wt induzem *XPC* em resposta ao agente indutor de *cross-link* utilizado, se esta não participa no reconhecimento dos ICLs?
- VI. Verificar nas amostras tumorais a expressão proteica também de *XPC*, *XPA* e *XPF*;
- VII. Verificar a importância relativa de *PTEN* *in vivo* diante do tratamento com ACNU, através de xenografias em camundongos;
- VIII. Verificar a influência da perda de *XPC*, *XPF*, *POLH* e *POLK* *in vivo* através de xenografias em camundongos.
- IX. Verificar o papel de NER e TLS no reparo das lesões induzidas por TMZ: na ausência de BER: NER ou *POLH* poderiam fazer o trabalho?

REFERÊNCIAS¹

- AAMANN, M. D. et al. Multiple interaction partners for Cockayne syndrome proteins: implications for genome and transcriptome maintenance. **Mech. Ageing Dev.**, v. 134, n. 5-6, p. 212-224, May-Jun 2013.
- ABOUNADER, R. Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. **Expert Rev. Anticancer Ther.**, v. 9, n. 2, p. 235-245, Feb 2009.
- ADAMO, A. et al. Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. **Mol. Cell**, v. 39, n. 1, p. 25-35, Jul 9 2010.
- AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 25-41, Feb 2012.
- AHMAD, A. et al. Mislocalization of XPF-ERCC1 nuclease contributes to reduced DNA repair in XP-F patients. **PLoS Genet.**, v. 6, n. 3, p. e1000871, Mar 2010.
- AHN, B. et al. Repair of mitomycin C cross-linked DNA in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. **Mol. Cells**, v. 18, n. 2, p. 249-255, Oct 31 2004.
- AKHTAR, R. S. et al. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 27, p. 7257-7264, Jul 5 2006.
- AKSENOV, S. V. Induction of the SOS Response in Ultraviolet-Irradiated Escherichia coli Analyzed by Dynamics of LexA, RecA and Sula Proteins. **J. Biol. Phys.**, v. 25, n. 2-3, p. 263-277, Jun 1999.
- AL-MINAWI, A. Z. et al. The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 19, p. 6400-6413, Oct 2009.
- ALIMONTI, A. et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 3, p. 681-693, Mar 2010.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALLOCATI, N.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. **Exp. Cell Res.**, v. 318, n. 11, p. 1285-1290, Jul 1 2012.

AMES, B. N.; GOLD, L. S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutat. Res.**, v. 250, n. 1-2, p. 3-16, Sep-Oct 1991.

ANTON, K.; BAEHRING, J. M.; MAYER, T. Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 26, n. 4, p. 825-853, Aug 2012.

ARAKI, M. et al. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 22, p. 18665-18672, Jun 1 2001.

ARMELINI, M. G. et al. Exploring DNA damage responses in human cells with recombinant adenoviral vectors. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 26, n. 11, p. 899-906, Nov 2007.

AUERBACH, A. D. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutat. Res.**, v. 668, n. 1-2, p. 4-10, Jul 31 2009.

AUERBACH, A. D.; WOLMAN, S. R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. **Nature**, v. 261, n. 5560, p. 494-496, Jun 10 1976.

BACCELLI, I.; TRUMPP, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. **J. Cell Biol.**, v. 198, n. 3, p. 281-293, Aug 6 2012.

BADIE, B. et al. Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. **J. Neuroimmunol.**, v. 120, n. 1-2, p. 19-24, Nov 1 2001.

BADIE, B.; SCHARTNER, J. M. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. **Neurosurgery**, v. 46, n. 4, p. 957-961; discussion 961-2, Apr 2000.

BAERENFALLER, K.; FISCHER, F.; JIRICNY, J. Characterization of the "mismatch repairosome" and its role in the processing of modified nucleosides in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 408, p. 285-303, 2006.

BAI, L.; ZHU, W. G. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. **J. Cancer Mol.**, v. 2, n. 4, p. 141-153, 2006.

BAILEY, P.; CUSHING, H. **A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis.** 1926.

BALSS, J. et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol.**, v. 116, n. 6, p. 597-602, Dec 2008.

BAO, S. et al. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. **Cancer Res.**, v. 68, n. 15, p. 6043-6048, Aug 1 2008.

BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 10, p. 792-804, Oct 2004.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 6, p. 738-747, Dec 2001a.

_____. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. **FEBS Lett.**, v. 490, n. 3, p. 117-122, Feb 16 2001b.

BARTKOVA, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 633-637, Nov 30 2006.

BATISTA, L. F. et al. 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. 11886-11895, Dec 15 2007.

BECKER, K. et al. DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 541-546, Mar 2003.

BECKER, K.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. Does increase in DNA repair allow "tolerance-to-insult" in chemical carcinogenesis? Skin tumor experiments with MGMT-overexpressing mice. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 55, n. 2, p. 145-150, Mar 2014.

BEIER, D. et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. **Cancer Res.**, v. 67, n. 9, p. 4010-4015, May 1 2007.

BELLIZZI, A. M.; FRANKEL, W. L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 16, n. 6, p. 405-417, Nov 2009.

BELYSI, V. A. et al. The origins and evolution of the p53 family of genes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 6, p. a001198, Jun 2009.

BENHAMOU, S.; SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. **Mutat. Res.**, v. 462, n. 2-3, p. 149-158, Apr 2000.

BENJAMIN, R.; CAPPARELLA, J.; BROWN, A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. **Cancer J.**, v. 9, n. 2, p. 82-90, Mar-Apr 2003.

BERGSTRALH, D. T.; SEKELSKY, J. Interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? **Trends Genet.**, v. 24, n. 2, p. 70-76, Feb 2008.

BERNDT, S. I. et al. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 15, n. 11, p. 2263-2269, Nov 2006.

BERNEBURG, M.; LEHMANN, A. R. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. **Adv. Genet.**, v. 43, p. 71-102, 2001.

BERRIE, C. P. Phosphoinositide 3-kinase inhibition in cancer treatment. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 10, n. 6, p. 1085-1098, Jun 2001.

BESSHO, T.; MU, D.; SANCAR, A. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, n. 12, p. 6822-6830, Dec 1997.

BHAGWAT, N. R. et al. Immunodetection of DNA repair endonuclease ERCC1-XPF in human tissue. **Cancer Res.**, v. 69, n. 17, p. 6831-6838, Sep 1 2009.

BIERNAT, W. et al. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 56, n. 2, p. 180-185, Feb 1997.

BLATTNER, C. Regulation of p53: the next generation. **Cell Cycle**, v. 7, n. 20, p. 3149-3153, Oct 2008.

BOGLIOLO, M. et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 92, n. 5, p. 800-806, May 2 2013.

BOOSANI, C. S.; AGRAWAL, D. K. PTEN modulators: a patent review. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 23, n. 5, p. 569-580, May 2013.

BOTA, D. A. et al. Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 3, n. 5, p. 707-715, Oct 2007.

BOUQUET, F.; MULLER, C.; SALLES, B. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. **Cell Cycle**, v. 5, n. 10, p. 1116-1122, May 2006.

BOURDON, J. C. et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Dev.**, v. 19, n. 18, p. 2122-2137, Sep 15 2005.

BRECKENRIDGE, D. G. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8608-8618, Nov 24 2003.

BRONSTEIN, S. M. et al. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. **Cancer Res.**, v. 51, n. 19, p. 5188-5197, Oct 1 1991.

BRUNN, G. J. et al. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. **Embo J.**, v. 15, n. 19, p. 5256-5267, Oct 1 1996.

BUERMEYER, A. B. et al. Mammalian DNA mismatch repair. **Annu. Rev. Genet.**, v. 33, p. 533-564, 1999.

BURZ, C. et al. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncol.**, v. 48, n. 6, p. 811-821, 2009.

CANKOVIC, M. et al. The Role of MGMT Testing in Clinical Practice: A Report of the Association for Molecular Pathology. **J. Mol. Diagn.**, Jul 16 2013.

CASTRO, M. A. et al. Evolutionary origins of human apoptosis and genome-stability gene networks. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. 19, p. 6269-6283, Nov 2008.

CAVALLO, F. et al. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, n. 3, p. 319-326, Mar 2011.

CBTRUS. **Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2004–2007.** . STATES., C. B. T. R. U. S: 57 p. 2011.

CELESTE, A. et al. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. **Cell**, v. 114, n. 3, p. 371-383, Aug 8 2003.

CHAMBERLAIN, M. C. Emerging clinical principles on the use of bevacizumab for the treatment of malignant gliomas. **Cancer**, v. 116, n. 17, p. 3988-3999, Sep 1 2010.

CHAN, M. D. et al. Radiation oncology in brain tumors: current approaches and clinical trials in progress. **Neuroimaging Clin. N. Am.**, v. 20, n. 3, p. 401-408, Aug 2010.

CHEN, C. et al. The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. **Eur. J. Neurol.**, v. 20, n. 2, p. 223-230, Feb 2012.

CHEN, J.; XU, T. Recent therapeutic advances and insights of recurrent glioblastoma multiforme. **Front. Biosci.**, v. 18, p. 676-684, 2013.

CHEN, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725-730, Aug 4 2005.

_____. Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression. **Cancer Res.**, v. 67, n. 10, p. 4578-4585, May 15 2007.

CHENEY, I. W. et al. Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. **Cancer Res.**, v. 58, n. 11, p. 2331-2334, Jun 1 1998.

CHIPUK, J. E. et al. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. **Cancer Cell**, v. 4, n. 5, p. 371-381, Nov 2003.

CHO, Y. et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 346-355, Jul 15 1994.

CHOY, W. et al. CD133 as a marker for regulation and potential for targeted therapies in glioblastoma multiforme. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 3, p. 391-405, Jul 2012.

CHRISTMANN, M. et al. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1816, n. 2, p. 179-190, Dec 2011.

CHUMBALKAR, V. C. et al. Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1167-1177, Mar 2005.

CIMMINO, G. et al. Poly(ADPR)polymerase-1 signalling of the DNA damage induced by DNA topoisomerase I poison in D54(p53wt) and U251(p53mut) glioblastoma cell lines. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 1, p. 49-56, Jan 2007.

CLARK, M. J. et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. **PLoS Genet.**, v. 6, n. 1, p. e1000832, Jan 2010.

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nat. Rev. Genet.**, v. 10, n. 11, p. 756-768, Nov 2009.

COHEN, A. L.; HOLMEN, S. L.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, v. 13, n. 5, p. 345, May 2013.

COLEN, C. B.; ALLCUT, E. Quality of life and outcomes in glioblastoma management. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 3, p. 507-513, Jul 2012.

COSTA, R. M. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-1099, Nov 2003.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 7, p. 501-507, Jul 2009.

CROSSAN, G. P.; PATEL, K. J. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. **J. Pathol.**, v. 226, n. 2, p. 326-337, Jan 2011.

CRUET-HENNEQUART, S. et al. DNA polymerase eta, a key protein in translesion synthesis in human cells. **Subcell. Biochem.**, v. 50, p. 189-209, 2010.

DAI, Q. S. et al. XPC gene polymorphisms contribute to bladder cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumour Biol.**, v. 35, n. 1, p. 447-453, Jan 2014.

_____. Poly (AT) deletion/insertion polymorphism of the XPC gene contributes to urinary system cancer susceptibility: a meta-analysis. **Gene**, v. 528, n. 2, p. 335-342, Oct 10 2013.

DAI, Y.; GRANT, S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 2, p. 376-383, Jan 15 2010.

DAS, S. et al. P53 promoter selection: choosing between life and death. **Cell Cycle**, v. 7, n. 2, p. 154-157, Jan 15 2008.

DAYA-GROSJEAN, L. et al. An immortalized xeroderma pigmentosum, group C, cell line which replicates SV40 shuttle vectors. **Mutat. Res.**, v. 183, n. 2, p. 185-196, Mar 1987.

DE FERAUDY, S. et al. The DNA damage-binding protein XPC is a frequent target for inactivation in squamous cell carcinomas. **Am. J. Pathol.**, v. 177, n. 2, p. 555-562, Aug 2010.

DE PALMA, M.; HANAHAN, D. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. **Mol. Oncol.**, v. 6, n. 2, p. 111-127, Apr 2012.

DE SILVA, I. U. et al. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n. 21, p. 7980-7990, Nov 2000.

DEAKYNE, J. S.; MAZIN, A. V. Fanconi anemia: at the crossroads of DNA repair. **Biochemistry (Mosc)**, v. 76, n. 1, p. 36-48, Jan 2011.

DEANS, A. J.; WEST, S. C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 7, p. 467-480, Jul 2011.

DEIGHTON, R. F. et al. Glioma pathophysiology: insights emerging from proteomics. **Brain Pathol.**, v. 20, n. 4, p. 691-703, Jul 2010.

DELEO, A. B. et al. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, n. 5, p. 2420-2424, May 1979.

DISERENS, A. C. et al. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. **Acta Neuropathol.**, v. 53, n. 1, p. 21-28, 1981.

DIX, A. R. et al. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. **J. Neuroimmunol.**, v. 100, n. 1-2, p. 216-232, Dec 1999.

DONEHOWER, L. A. Using mice to examine p53 functions in cancer, aging, and longevity. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, n. 6, p. a001081, Dec 2009.

DOTSCH, V. et al. p63 and p73, the ancestors of p53. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 9, p. a004887, Sep 2010.

DOUGLAS, J. A. et al. History and molecular genetics of Lynch syndrome in family G: a century later. **JAMA**, v. 294, n. 17, p. 2195-2202, Nov 2 2005.

DRABLOS, F. et al. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 11, p. 1389-1407, Nov 2 2004.

DUCKETT, D. R. et al. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 13, p. 6443-6447, Jun 25 1996.

DUMAZ, N. et al. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 22, p. 10529-10533, Nov 15 1993.

EICH, M. et al. Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) causes resistance to methylating anticancer drugs such as temozolomide. **Mol. Pharmacol.**, v. 78, n. 5, p. 943-951, Nov 2010.

_____. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. **Mol. Cancer Ther.**, v. 12, n. 11, p. 2529-2540, Nov 2013.

ELROD, H. A.; SUN, S. Y. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. **Cancer Biol. Ther.**, v. 7, n. 2, p. 163-173, Feb 2008.

ENGLAND, B.; HUANG, T.; KARSY, M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. **Tumour Biol.**, v. 34, n. 4, p. 2063-2074, Aug 2013.

FAHRER, J.; KAINA, B. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (Mgmt) in the Defense against N-Nitroso Compounds and Colorectal Cancer. **Carcinogenesis**, Aug 8 2013.

FARNEBO, M.; BYKOV, V. J.; WIMAN, K. G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 396, n. 1, p. 85-9, May 21 2010.

FECCHI, P. E. et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. **Cancer Res.**, v. 66, n. 6, p. 3294-3302, Mar 15 2006.

FERECATU, I. et al. Tickets for p53 journey among organelles. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 4214-4228, 2009.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int. J. Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, Dec 15 2010.

FERRANDO, J. et al. Further insights in trichothiodystrophy: a clinical, microscopic, and ultrastructural study of 20 cases and literature review. **Int. J. Trichology**, v. 4, n. 3, p. 158-163, Jul 2012.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876-885, Nov 2005.

FIGARELLA-BRANGER, D. et al. [Cell cycle regulators and cancer]. **Ann. Pathol.**, v. 18, n. 3, p. 178-186, Jul 1998.

FISHER, L. A.; BESSHO, M.; BESSHO, T. Processing of a psoralen DNA interstrand cross-link by XPF-ERCC1 complex in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 3, p. 1275-1281, Jan 18 2008.

FLECK, O.; SCHAR, P. Translesion DNA synthesis: little fingers teach tolerance. **Curr. Biol.**, v. 14, n. 10, p. R389-391, May 25 2004.

FOORD, O. S. et al. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 19, p. 5191-5198, Oct 11 1991.

FRICKER, S. P. et al. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 5, p. 588-596, Aug 28 2006.

FRIEDBERG, E. C. Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20, n. 10, p. 381, Oct 1995.

FUJISAWA, H. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. **Lab Invest.**, v. 80, n. 1, p. 65-72, Jan 2000.

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **J. Nucleic Acids**, v. 2010, 2010.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 3, p. 511-515, Feb 1 2009.

FURNARI, F. B. et al. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 23, p. 12479-12484, Nov 11 1997.

GALLI, R. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. **Cancer Res.**, v. 64, n. 19, p. 7011-7021, Oct 1 2004.

GANGEMI, R. M. et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. **Stem Cells**, v. 27, n. 1, p. 40-48, Jan 2009.

GENNERY, A. R. Primary immunodeficiency syndromes associated with defective DNA double-strand break repair. **Br. Med. Bull.**, v. 77-78, p. 71-85, 2006.

GEORGESCU, M. M. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. **Genes Cancer**, v. 1, n. 12, p. 1170-1177, Dec 2010.

GHARBI, S. I. et al. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. **Biochem. J.**, v. 404, n. 1, p. 15-21, May 15 2007.

GILL, J. P.; WANG, J.; MILLAR, D. P. DNA polymerase activity at the single-molecule level. **Biochem. Soc. Trans**, v. 39, n. 2, p. 595-599, Apr 2011.

GOMBAR, C. T.; TONG, W. P.; LUDLUM, D. B. Mechanism of action of the nitrosoureas--IV. Reactions of bis-chloroethyl nitrosourea and chloroethyl cyclohexyl nitrosourea with deoxyribonucleic acid. **Biochem. Pharmacol.**, v. 29, n. 19, p. 2639-2643, Oct 1 1980.

GRAEBER, M. B.; SCHEITHAUER, B. W.; KREUTZBERG, G. W. Microglia in brain tumors. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 252-259, Nov 2002.

GREGG, S. Q.; ROBINSON, A. R.; NIEDERNHOFER, L. J. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. **DNA Repair (Amst)**, v. 10, n. 7, p. 781-791, Jul 15 2011.

GROMBACHER, T.; EICHHORN, U.; KAINA, B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. **Oncogene**, v. 17, n. 7, p. 845-851, Aug 20 1998.

GROSS, J. L. et al. Plasminogen activator and inhibitor activity in human glioma cells and modulation by sodium butyrate. **Cancer Res.**, v. 48, n. 2, p. 291-296, Jan 15 1988.

GRULICH, A. E. et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. **Lancet**, v. 370, n. 9581, p. 59-67, Jul 7 2007.

GUERVILLY, J. H. et al. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. **Hum. Mol. Genet.**, v. 20, n. 11, p. 2171-2181, Jun 1 2011.

GUO, L. et al. Glioblastoma multiforme with subcutaneous metastases, case report and literature review. **J. Korean Neurosurg. Soc.**, v. 52, n. 5, p. 484-487, Nov 2012.

GUPTA, S.; GELLERT, M.; YANG, W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutSbeta bound to unpaired DNA loops. **Nat. Struct Mol. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 72-78, Jan 2011.

HAFSI, S. et al. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). **Int. J. Oncol.**, v. 40, n. 3, p. 639-644, Mar 2012.

HAPPOLD, C. et al. ACNU-based chemotherapy for recurrent glioma in the temozolomide era. **J. Neurooncol.**, v. 92, n. 1, p. 45-48, Mar 2009.

HARACSKA, L. et al. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ . **Nat. Genet.**, v. 25, n. 4, p. 458-461, Aug 2000.

HAUPT, Y. et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. **Genes Dev.**, v. 9, n. 17, p. 2170-2183, Sep 1 1995.

HERMEKING, H. et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. **Mol. Cell**, v. 1, n. 1, p. 3-11, Dec 1997.

HERMISSON, M. et al. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. **J. Neurochem.**, v. 96, n. 3, p. 766-776, Feb 2006.

HINZ, J. M. Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 51, n. 6, p. 582-603, Jul 2010.

HLAVIN, E. M. et al. Cross-link structure affects replication-independent DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3977-3988, May 11 2010.

HOFFMAN, W. H. et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 5, p. 3247-3257, Feb 1 2002.

HOFFMANN, J. S.; CAZAUX, C. Aberrant expression of alternative DNA polymerases: a source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 20, n. 5, p. 312-319, Oct 2010.

HOLLANDER, M. C. et al. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 37, p. 13200-13205, Sep 13 2005.

HOLLOMAN, W. K. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, n. 7, p. 748-754, Jul 2011.

HOOGERVORST, E. M.; VAN STEEG, H.; DE VRIES, A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. **Mutat. Res.**, v. 574, n. 1-2, p. 3-21, Jul 1 2005.

HSIEH, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. **Mutat. Res.**, v. 486, n. 2, p. 71-87, Jul 12 2001.

HU, W.; FENG, Z.; LEVINE, A. J. The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. **Genes Cancer**, v. 3, n. 3-4, p. 199-208, Mar 2012.

HU, X. et al. Relative gene-silencing efficiencies of small interfering RNAs targeting sense and antisense transcripts from the same genetic locus. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 15, p. 4609-4617, 2004.

HULL, D. R.; KANTOR, G. J. Evidence that DNA excision-repair in xeroderma pigmentosum group A is limited but biologically significant. **Mutat. Res.** v. 112, n. 3, p. 169-179, Jun 1983.

HWANG, B. J. et al. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 2, p. 424-428, Jan 19 1999.

IKEHATA, H.; ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **J. Radiat. Res.**, v. 52, n. 2, p. 115-125, 2011.

ISHII, N. et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathol.**, v. 9, n. 3, p. 469-479, Jul 1999.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G.; FLORES, E. R. Li-Fraumeni syndrome: a p53 family affair. **Cell Cycle**, v. 4, n. 7, p. 865-867, Jul 2005.

IYAMA, T.; WILSON, D. M., 3RD. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 8, p. 620-636, Aug 2013.

JACOBS, J. P.; JONES, C. M.; BAILLE, J. P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. **Nature**, v. 227, n. 5254, p. 168-170, Jul 11 1970.

JANICIJEVIC, A. et al. DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. **DNA Repair (Amst)**, v. 2, n. 3, p. 325-336, Mar 1 2003.

JEFFREY, A. M. DNA modification by chemical carcinogens. **Pharmacol. Ther.**, v. 28, n. 2, p. 237-272, 1985.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J. Clin.**, v. 58, n. 2, p. 71-96, Mar-Apr 2008.

JOENJE, H.; PATEL, K. J. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 6, p. 446-457, Jun 2001.

JOHNSON, D. R.; CHANG, S. M. Recent medical management of glioblastoma. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 746, p. 26-40, 2012.

JOHNSON, K. A. The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1804, n. 5, p. 1041-1048, May 2010.

JOHNSON, R. E. et al. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 263-265, Jul 9 1999.

JOHNSON, T. M. et al. Knockin mice expressing a chimeric p53 protein reveal mechanistic differences in how p53 triggers apoptosis and senescence. **Proc. Natl.. Acad. Sci. U S A**, v. 105, n. 4, p. 1215-1220, Jan 29 2008.

JONES, R. M.; PETERMANN, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. **Biochem. J.**, v. 443, n. 1, p. 13-26, Apr 1 2012.

JONGMANS, W. et al. Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, n. 9, p. 5016-5022, Sep 1997.

JOO, K. M. et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. **Lab Invest.**, v. 88, n. 8, p. 808-815, Aug 2008.

KAINA, B.; AURICH, O. Mutagenic and genotoxic effects of O6-methylguanine: a revision. **Mutat. Res.**, v. 139, n. 3, p. 149-54, Mar 1984.

KAINA, B.; CHRISTMANN, M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 40, n. 8, p. 354-367, Aug 2002.

KAINA, B. et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1079-1099, Aug 1 2007.

KAINA, B.; FRITZ, G.; COQUERELLE, T. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene

mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 22, n. 4, p. 283-292, 1993.

KAINA, B.; HEINDORFF, K.; AURICH, O. O6-methylguanine, but not N7-methylguanine or N3-methyladenine, induces gene mutations, sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells. **Mutat. Res.**, v. 108, n. 1-3, p. 279-292, Mar 1983.

KAINA, B.; MARGISON, G. P.; CHRISTMANN, M. Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 21, p. 3663-3681, Nov 2010.

KAKAROUGKAS, A.; JEGGO, P. A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. **Br. J. Radiol.**, v. 87, n. 1035, p. 20130685, Mar 2014.

KAKUDO, Y. et al. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. **Cancer Res.**, v. 65, n. 6, p. 2108-2114, Mar 15 2005.

KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. **Trends Genet.**, v. 11, n. 4, p. 136-140, Apr 1995.

KANNOUCHE, P.; STARY, A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1123-1132, Nov 2003.

KANU, O. O. et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clin. Med. Oncol.**, v. 3, p. 39-52, Apr 8 2009.

KASS, E. M.; JASIN, M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 17, p. 3703-3708, Sep 10.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, Nov 18 2004.

KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. DNA damage and cell cycle checkpoints. **FASEB J.**, v. 10, n. 2, p. 238-247, Feb 1996.

KAWAMOTO, T. et al. Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. **Mol. Cell**, v. 20, n. 5, p. 793-799, Dec 9 2005.

KEIJZER, W. et al. Establishment and characterization of a melanoma cell line from a xeroderma pigmentosum patient: activation of N-ras at a potential pyrimidine dimer site. **Cancer Res.**, v. 49, n. 5, p. 1229-1235, Mar 1 1989.

KHOURY, M. P.; BOURDON, J. C. The isoforms of the p53 protein. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 3, p. a000927, Mar 2010.

_____. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? **Genes Cancer**, v. 2, n. 4, p. 453-65, Apr 2011.

KIM, H.; D'ANDREA, A. D. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. **Genes Dev.**, v. 26, n. 13, p. 1393-1408, Jul 1 2012.

KIM, J. M. et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. **Dev. Cell**, v. 16, n. 2, p. 314-320, Feb 2009.

KITAO, H.; TAKATA, M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. **Int. J. Hematol.**, v. 93, n. 4, p. 417-424, Apr 2011.

KLECZKOWSKA, H. E. et al. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. **Genes Dev.**, v. 15, n. 6, p. 724-736, Mar 15 2001.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 44-51, Jan 1999.

KLEIJER, W. J. et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 5, p. 744-750, May 3 2008.

KNIGHT, Z. A. Small molecule inhibitors of the PI3-kinase family. **Curr. Top MicroBiol. Immunol.**, v. 347, p. 263-278, 2010.

KNIGHTS, M. J.; KYLE, S.; ISMAIL, A. Characteristic features of stem cells in glioblastomas: from cellular biology to genetics. **Brain Pathol.**, v. 22, n. 5, p. 592-606, Sep 2012.

KNIZHNIK, A. V. et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55665, 2013.

KNOCH, J. et al. Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. **Eur. J. Dermatol.**, v. 22, n. 4, p. 443-455, Jul-Aug 2012.

KOBERLE, B. et al. ERCC1 and XPF expression in human testicular germ cell tumors. **Oncol. Rep.**, v. 23, n. 1, p. 223-227, Jan 2010.

KONG, D.; YAMORI, T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. **Cancer Sci.**, v. 99, n. 9, p. 1734-1740, Sep 2008.

KOTTEMANN, M. C.; SMOGORZEWSKA, A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 356-363, Jan 17 2013.

KRAAKMAN-VAN DER ZWET, M. et al. immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. **Mutat. Res.**, v. 434, n. 1, p. 17-27, May 14 1999.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 789-795, Oct 12 2000.

KREISL, T. N. Chemotherapy for malignant gliomas. **Semin. Radiat. Oncol.**, v. 19, n. 3, p. 150-154, Jul 2009. ISSN 1532-9461 (Electronic).

KUHNE, M. et al. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. **Cancer Res.**, v. 64, n. 2, p. 500-508, Jan 15 2004.

KUSUMOTO, R. et al. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. **Mutat. Res.**, v. 485, n. 3, p. 219-227, Apr 4 2001.

LA PORTA, C. A. Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. **World J. Stem Cells**, v. 4, n. 3, p. 17-20, Mar 26 2012.

LAFARGE-FRAYSSINET, C. et al. Cellular genes possibly involved in the transformation process of the human melanoma cell line XP44 RO (Mel). **Anticancer Res.**, v. 15, n. 4, p. 1205-1213, Jul-Aug 1995.

LAI, J. P. et al. The influence of DNA repair on neurological degeneration, cachexia, skin cancer and internal neoplasms: autopsy report of four xeroderma pigmentosum patients (XP-A, XP-C and XP-D). **Acta Neuropathol. Commun.**, v. 1, n. 1, p. 4, 2013

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7644-7655, Dec 13 1999.

LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, B. A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 4, p. 705-713, Oct 2006.

LAMARCHE, B. J.; ORAZIO, N. I.; WEITZMAN, M. D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 17, p. 3682-3695, Sep 10

LAMBERT, W. C.; GAGNA, C. E.; LAMBERT, M. W. Trichothiodystrophy: Photosensitive, TTD-P, TTD, Tay syndrome. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 685, p. 106-110, 2010.

LARSSON, L. G. Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. **Semin. Cancer Biol.**, v. 21, n. 6, p. 367-376, Dec 2011.

LATHIA, J. D. et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 5, p. 421-432, May 7 2010.

LEHMANN, A. R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1101-1111, Nov 2003.

LEHMANN, A. R.; FUCHS, R. P. Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. **DNA Repair (Amst)**, v. 5, n. 12, p. 1495-1498, Dec 9 2006.

LEHMANN, A. R.; MCGIBBON, D.; STEFANINI, M. Xeroderma pigmentosum. **Orphanet. J. Rare Dis.**, v. 6, p. 70, 2011.

LEHOCZKY, P.; MCHUGH, P. J.; CHOVANEC, M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 2, p. 109-133, Mar 2007.

LEITE, R. A. et al. Identification of XP complementation groups by recombinant adenovirus carrying DNA repair genes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 129, n. 2, p. 502-506, Feb 2009.

LEMAN, A. R.; NOGUCHI, E. The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. **Genes (Basel)**, v. 4, n. 1, p. 1-32, Mar 1 2013.

LI, D. W. et al. Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. **Oncogene**, v. 25, n. 21, p. 3006-3022, May 18 2006.

LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res.**, v. 18, n. 1, p. 85-98, Jan 2008

LI, Y. M. et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proc. Natl.. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 20, p. 11047-11052, Oct 1 1996.

LIANG, S. H.; CLARKE, M. F. A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 46, p. 32699-32703, Nov 12 1999.

_____. Regulation of p53 localization. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 10, p. 2779-2783, May 2001.

LIANG, S. H.; HONG, D.; CLARKE, M. F. Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 31, p. 19817-19821, Jul 31 1998.

LIANG, Y. et al. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. **World J. Surg.**, v. 33, n. 4, p. 661-666, Apr 2009.

LIEBER, M. R. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. **Nat. Struct Mol. Biol.**, v. 17, n. 4, p. 393-395, Apr 2010.

LIEBER, M. R. et al. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. **Subcell Biochem.**, v. 50, p. 279-296, 2010.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-715, Apr 22 1993.

LIPS, J.; KAINA, B. Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. **Mutat. Res.**, v. 487, n. 1-2, p. 59-66, Nov 1 2001.

LIU, J. et al. Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 9, p. 1319-1324, Apr 16 2008.

LIVNEH, Z.; ZIV, O.; SHACHAR, S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 4, p. 729-735, Feb 15 2010.

LOBITZ, S.; VELLEUER, E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 11, p. 893-898, Nov 2006.

LOPEZ-GIRONA, A. et al. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. **Nature**, v. 397, n. 6715, p. 172-175, Jan 14 1999.

LOPEZ-GIRONA, A.; KANO, J.; RUSSELL, P. Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 50-54, Jan 9 2001.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007.

LU, A. L. et al. MutY and MutY homologs (MYH) in genome maintenance. **Front. Biosci.**, v. 11, p. 3062-3080, 2006.

LYNCH, H. T.; LYNCH, J. F. 25 years of HNPCC. **Anticancer Res.**, v. 14, n. 4B, p. 1617-1624, Jul-Aug 1994.

MACFARLANE, M. Cell death pathways--potential therapeutic targets. **Xenobiotica**, v. 39, n. 8, p. 616-624, Aug 2009.

MAGNALDO, T.; SARASIN, A. Xeroderma pigmentosum: from symptoms and genetics to gene-based skin therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 177, n. 3, p. 189-198, 2004.

MAHE, C. et al. Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, n. 3, p. 404-410, Oct 2004.

MALKIN, D. Li-fraumeni syndrome. **Genes Cancer**, v. 2, n. 4, p. 475-484, Apr 2011.

MANCHADO, E.; EGUREN, M.; MALUMBRES, M. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 38, n. Pt 1, p. 65-71, Feb 2010.

MANESS, P. F.; SCHACHNER, M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. **Nat. Neurosci.**, v. 10, n. 1, p. 19-26, Jan 2007.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, n. 1, p. 27-39, Feb 2010.

MARCEL, V. et al. Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 21, p. 4463-4468, Nov 5 2010.

MARCHENKO, N. D.; MOLL, U. M. The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. **Cell Cycle**, v. 6, n. 14, p. 1718-1723, Jul 15 2007.

MARCHENKO, N. D.; ZAIKA, A.; MOLL, U. M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 21, p. 16202-16212, May 26 2000.

MARJANOVIC, N. D.; WEINBERG, R. A.; CHAFFER, C. L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. **Clin. Chem.**, v. 59, n. 1, p. 168-179, Jan 2013.

MARKERT, E. K.; LEVINE, A. J.; VAZQUEZ, A. Proliferation and tissue remodeling in cancer: the hallmarks revisited. **Cell Death Dis.**, v. 3, p. e397, 2012.

MARTIN-LOPEZ, J. V.; FISHEL, R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. **Fam. Cancer**, v. 12, n. 2, p. 159-168, Jun 2013.

MARTINEZ, A. et al. Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi anemia cells after mitomycin C and hydroxyurea treatment. **Mutat. Res.**, v. 656, n. 1-2, p. 1-7, Oct 30 2008.

MASUTANI, C. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . **Nature**, v. 399, n. 6737, p. 700-704, Jun 17 1999.

MCDOWELL, K. A.; RIGGINS, G. J.; GALLIA, G. L. Targeting the AKT pathway in glioblastoma. **Curr. Pharm Des.**, v. 17, n. 23, p. 2411-2420, 2011.

MCGIRT, M. J. et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. **J. Neurosurg.**, v. 110, n. 1, p. 156-162, Jan 2009.

MCILWRAITH, M. J. et al. Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. **Mol. Cell**, v. 20, n. 5, p. 783-792, Dec 9 2005.

MCNEIL, E. M.; MELTON, D. W. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 20, p. 9990-10004, Nov 1 2012.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 714-723, Oct 2009.

MELLIER, G. et al. TRAILing death in cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 31, n. 1, p. 93-112, Feb 2010.

MELLON, I. et al. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 23, p. 8878-8882, Dec 1986.

MELLON, I.; SPIVAK, G.; HANAWALT, P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. **Cell**, v. 51, n. 2, p. 241-249, Oct 23 1987.

MENTRIKOSKI, M. et al. Glioblastoma multiforme in skin: a report of 2 cases and review of the literature. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 30, n. 4, p. 381-384, Aug 2008.

MEULMEESTER, E.; JOCHEMSEN, A. G. p53: a guide to apoptosis. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 2, p. 87-97, Mar 2008.

MICHEL, B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 7, p. e255, Jul 2005.

MIHARA, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Mol. Cell**, v. 11, n. 3, p. 577-590, Mar 2003.

MING, M.; HE, Y. Y. PTEN in DNA damage repair. **Cancer Lett.**, v. 319, n. 2, p. 125-129, Jun 28 2012.

MIRZAYANS, R. et al. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. **J. Bio Biotechnol.**, v. 2012, p. 170325, 2012.

MITRA, S.; KAINA, B. Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. **Prog Nucleic Acid Res Mol. Biol.**, v. 44, p. 109-142, 1993.

MITRUS, I. et al. Evolving models of tumor origin and progression. **Tumour Biol.**, v. 33, n. 4, p. 911-917, Aug 2012.

MONTAGNOLI, A. et al. Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells. **Cancer Res.**, v. 64, n. 19, p. 7110-7116, Oct 1 2004.

_____. A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. **Nat. Chem. Biol.**, v. 4, n. 6, p. 357-365, Jun 2008.

MORALES-RAMIREZ, P.; VALLARINO-KELLY, T.; CRUZ-VALLEJO, V. L. Effect of O6-chloroethylguanine DNA lesions on the kinetics and mechanism of micronucleus induction in vivo. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 51, n. 3, p. 236-242, Apr 2010.

MORALES-RAMIREZ, P. et al. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 207-213, May 2004.

MOSER, B. A.; RUSSELL, P. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 6, p. 631-636, Dec 2000.

MRUGALA, M. M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discov. Med.**, v. 15, n. 83, p. 221-230, Apr 2013.

MURRAY, A. W.; KIRSCHNER, M. W. What controls the cell cycle? **Sci. Am.**, v. 264, n. 3, p. 56-63, Mar 1991.

MUTTER, N.; STUPP, R. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? **Expert Rev. Anticancer Ther.**, v. 6, n. 8, p. 1187-1204, Aug 2006.

NAGASAWA, D. T. et al. Temozolomide and other potential agents for the treatment of glioblastoma multiforme. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 2, p. 307-322, ix, Apr 2012.

NAHAS, S. A.; GATTI, R. A. DNA double strand break repair defects, primary immunodeficiency disorders, and 'radiosensitivity'. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 510-516, Dec 2009.

NAKAMURA, J.; SWENBERG, J. A. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. **Cancer Res.**, v. 59, n. 11, p. 2522-2526, Jun 1 1999.

NARAYANA, A. et al. A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. **J. Neurosurg.**, v. 116, n. 2, p. 341-345, Feb 2012.

NARITA, Y. Drug review: Safety and efficacy of bevacizumab for glioblastoma and other brain tumors. **Jpn J. Clin. Oncol.**, v. 43, n. 6, p. 587-595, Jun 2013.

NIEDERNHOFER, L. J. et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1038-1043, Dec 21 2006.

NIERO, E. L. et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 33, p. 37, 2014.

NIKOLOVA, T. et al. The gammaH2AX Assay for Genotoxic and Nongenotoxic Agents: Comparison of H2AX Phosphorylation with Cell Death Response. **Toxicol. Sci.**, v. 140, n. 1, p. 103-117, Jul 1 2014.

_____. Chloroethylnitrosourea-induced cell death and genotoxicity: cell cycle dependence and the role of DNA double-strand breaks, HR and NHEJ. **Cell Cycle**, v. 11, n. 14, p. 2606-2619, Jul 15 2012

NISHI, R. et al. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 13, p. 5664-5674, Jul 2005.

NISTER, M.; HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. Clonal variation in the production of a platelet-derived growth factor-like protein and expression of corresponding receptors in a human malignant glioma. **Cancer Res.**, v. 46, n. 1, p. 332-340, Jan 1986.

NUTLEY, B. P. et al. Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-PK inhibitor NU7026. **Br. J. Cancer**, v. 93, n. 9, p. 1011-1018, Oct 31 2005.

NYBERG, K. A. et al. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. **Annu. Rev. Genet.**, v. 36, p. 617-656, 2002.

OESTERGAARD, V. H. et al. Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair. **Mol. Cell**, v. 28, n. 5, p. 798-809, Dec 14 2007.

OGI, T.; KANNOUCHE, P.; LEHMANN, A. R. Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. **J. Cell Sci.**, v. 118, n. Pt 1, p. 129-136, Jan 1 2005.

OHGAKI, H. Genetic pathways to glioblastomas. **Neuropathology**, v. 25, n. 1, p. 1-7, Mar 2005.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res.**, v. 64, n. 19, p. 6892-6899, Oct 1 2004.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, May 2007.

_____. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 12, p. 2235-2241, Dec 2009.

_____. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 4, p. 764-772, Feb 15 2013.

OKUMURA, N. et al. Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, v. 413, n. 3, p. 395-399, Sep 30 2011.

OLOPADE, O. I. et al. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. **Cancer Res.**, v. 52, n. 9, p. 2523-2529, May 1 1992.

OREN, M.; BARTEK, J. The sunny side of p53. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 826-828, Mar 9 2007.

OZOREN, N.; EL-DEIRY, W. S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. **Neoplasia**, v. 4, n. 6, p. 551-557, Nov-Dec 2002.

PACE, P. et al. Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. **Science**, v. 329, n. 5988, p. 219-223, Jul 9 2010.

PAN, Q. et al. Down-regulation of DNA polymerases kappa, eta, iota, and zeta in human lung, stomach, and colorectal cancers. **Cancer Lett.**, v. 217, n. 2, p. 139-147, Jan 20 2005.

PARDO, B.; GOMEZ-GONZALEZ, B.; AGUILERA, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 6, p. 1039-1056, Mar 2009.

PARKINSON, J. F.; WHEELER, H. T.; MCDONALD, K. L. Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma. **J. Clin. Neurosci.**, v. 15, n. 1, p. 1-8, Jan 2008.

PARNEY, I. F.; WALDRON, J. S.; PARSA, A. T. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. **J. Neurosurg.**, v. 110, n. 3, p. 572-582, Mar 2009.

PATEL, M. et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. **J. Neurooncol.**, v. 61, n. 3, p. 203-207, Feb 2003.

PAVLOV, Y. I.; SHCHERBAKOVA, P. V. DNA polymerases at the eukaryotic fork-20 years later. **Mutat. Res.**, v. 685, n. 1-2, p. 45-53, Mar 1 2010.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181-182, p. 475-481, Dec 27 2002.

PINES, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p. 181-212, 1995.

PINTO, D. M.; FLAUS, A. Structure and function of histone H2AX. **Subcell. Biochem.**, v. 50, p. 55-78, 2010.

POEHLMANN, A.; ROESSNER, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. **Pathol. Res. Pract.**, v. 206, n. 9, p. 591-601, Sep 15 2010.

PONTEN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glioma. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 74, n. 4, p. 465-486, 1968.

PONTEN, J.; WESTERMARK, B. Properties of human malignant glioma cells in vitro. **Med. Biol.**, v. 56, n. 4, p. 184-193, Aug 1978.

PORTER, K. R. et al. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. **Neuro Oncol.**, v. 12, n. 6, p. 520-527, Jun 2010.

POURQUIER, P. Agents alkylants. **Bulletin du Cancer**, v. 98, n. 11, p. 1237-1251, Nov 2011.

PREUSS, I.; THUST, R.; KAINA, B. Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. **Int. J. Cancer**, v. 65, n. 4, p. 506-512, Feb 8 1996.

PRINDLE, M. J.; LOEB, L. A. DNA polymerase delta in DNA replication and genome maintenance. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 53, n. 9, p. 666-82, Dec 2012.

QIAN, Y.; CHEN, X. Tumor suppression by p53: making cells senescent. **Histol. Histopathol.**, v. 25, n. 4, p. 515-526, Apr 2010.

QIAO, B. et al. In vitro functional effects of XPC gene rare variants from bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 4, p. 516-521, Apr 2011.

QUIROS, S.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27183, 2011.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. **Am. J. Pathol.**, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, Nov 2000.

REIFENBERGER, G. et al. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. **Cancer Res.**, v. 53, n. 12, p. 2736-2739, Jun 15 1993.

REISMAN, D. et al. Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. **Biochem. Res Int.**, v. 2012, p. 808934.

REYDERMAN, L. et al. Disposition and pharmacokinetics of temozolomide in rat. **Xenobiotica**, v. 34, n. 5, p. 487-500, May 2004.

RIETZE, R. L.; REYNOLDS, B. A. Neural stem cell isolation and characterization. **Methods Enzymol.**, v. 419, p. 3-23, 2006.

ROBERTS, D. W. et al. Glioblastoma multiforme treatment with clinical trials for surgical resection (aminolevulinic acid). **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 3, p. 371-377, Jul 2012.

ROBERTSON, A. B. et al. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 6, p. 981-993, Mar 2009. ISSN 1420-9071 (Electronic).

RODON, J.; INIESTA, M. D.; PAPADOPOULOS, K. Development of PARP inhibitors in oncology. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 18, n. 1, p. 31-43, Jan 2009. ISSN 1744-7658 (Electronic).

RODRIGUES, J. C. et al. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. **Neuro Oncol.**, v. 12, n. 4, p. 351-365, Apr 2013.

ROHALY, G. et al. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 21-32, Jul 15 2005.

ROOS, W. P. et al. 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.

_____. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 1, p. 72-86, Jan 1 2009.

ROYDS, J. A.; IACOPETTA, B. p53 and disease: when the guardian angel fails. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 6, p. 1017-1026, Jun 2006.

RUSSO, A. et al. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. **Ann. Oncol.**, v. 17 Suppl 7, p. vii115-23, Jun 2006.

RYAN, J. J. et al. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 13, p. 5878-5882, Jun 21 1994.

SALAVOURA, K. et al. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. **Anticancer Res.**, v. 28, n. 2B, p. 1263-1269, Mar-Apr 2008.

SALE, J. E.; LEHMANN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, n. 3, p. 141-152, Mar 2012.

SALEHAN, M. R.; MORSE, H. R. DNA damage repair and tolerance: a role in chemotherapeutic drug resistance. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 70, n. 1, p. 31-40, 2013.

SAMPETREAN, O.; SAYA, H. Characteristics of glioma stem cells. **Brain Tumor Pathol.**, Apr 13 2013.

SANADA, M. et al. Modes of actions of two types of anti-neoplastic drugs, dacarbazine and ACNU, to induce apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2657-2663, Dec 2007.

SARKARIA, J. N. et al. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 10, p. 2900-2908, May 15 2008.

SASAKI, M. S.; TONOMURA, A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. **Cancer Res.**, v. 33, n. 8, p. 1829-1836, Aug 1973.

SCHERER, H. J. A Critical Review: the Pathology of Cerebral Gliomas. **J. Neurol. Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 147-177, Apr 1940.

SCHLAPBACH, R.; FONTANA, A. Differential activity of bcl-2 and ICE enzyme family protease inhibitors on Fas and puromycin-induced apoptosis of glioma cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1359, n. 2, p. 174-180, Nov 27 1997.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 579-608, 2003.

SCOTT, T. L. et al. Repair of oxidative DNA damage and cancer - recent progress in DNA base excision repair. **Antioxid. Redox Signal**, Jul 31 2013.

_____. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. **Antioxid. Redox Signal**, v. 20, n. 4, p. 708-726, Feb 1 2014.

SEBESTA, M. et al. Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 9, p. 691-698, Sep 2013.

SENGUPTA, S. et al. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, p. 831090, 2012.

SHACHAR, S. et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. **Embo J.**, v. 28, n. 4, p. 383-393, Feb 18 2009.

SHACKELFORD, R. E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. **Environ. Health Perspect.**, v. 107 Suppl 1, p. 5-24, Feb 1999.

SHANKARAN, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107-1111, Apr 26 2001.

SHAPIRO, G. I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 11, p. 1770-1783, Apr 10 2006.

SHARMA, S. et al. REV1 and polymerase zeta facilitate homologous recombination repair. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 2, p. 682-691, Jan 2012.

SHAULSKY, G.; BEN-ZE'EV, A.; ROTTER, V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. **Oncogene**, v. 5, n. 11, p. 1707-1711, Nov 1990.

SHAULSKY, G. et al. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. **Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 6565-6577, Dec 1990.

SHI, T. Y. et al. Association between XPF polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e38606, 2012.

SHOWALTER, A. K. et al. Mechanistic comparison of high-fidelity and error-prone DNA polymerases and ligases involved in DNA repair. **Chem. Rev.**, v. 106, n. 2, p. 340-360, Feb 2006.

SHUKLA, P. et al. DNA interstrand cross link repair: understanding role of Fanconi Anemia pathway and therapeutic implications. **Eur. J. Haematol.**, Jul 17 2013.

SINGH, S.; DIRKS, P. B. Brain tumor stem cells: identification and concepts. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 18, n. 1, p. 31-38, viii, Jan 2007.

SINGH, S. K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 18, p. 5821-58218, Sep 15 2003.

_____. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, Nov 18 2004.

SON, M. J. et al. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 440-452, May 8 2009.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, n. 5, p. 283-296, May 2012.

SOUFIR, N. et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 6, p. 1537-1542, Jun 2010.

SOULIER, J. Fanconi anemia. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, v. 2011, p. 492-497, 2011.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. **Cancer Cell**, v. 12, n. 4, p. 303-312, Oct 2007.

ST CLAIR, S. et al. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. **Mol. Cell**, v. 16, n. 5, p. 725-736, Dec 3 2004.

STALLONS, L. J.; MCGREGOR, W. G. Translesion synthesis polymerases in the prevention and promotion of carcinogenesis. **J. Nucleic Acids**, v. 2010, 2010.

STANCEL, J. N. et al. Polk mutant mice have a spontaneous mutator phenotype. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 12, p. 1355-1362, Dec 3 2009.

STEFANINI, M. et al. Trichothiodystrophy: from basic mechanisms to clinical implications. **DNA Repair (Amst)**, v. 9, n. 1, p. 2-10, Jan 2 2010.

STEIN, R. C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 3, p. 237-248, Sep 2001.

STIFF, T. et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. **Cancer Res.**, v. 64, n. 7, p. 2390-2396, Apr 1 2004.

STOMMEL, J. M. et al. 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. 1660-1672, Mar 15 1999.

STUPP, R.; VAN DEN BENT, M. J.; HEGI, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, v. 5, n. 3, p. 198-206, May 2005.

SU, X.; HUANG, J. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. **Protein Cell**, v. 2, n. 9, p. 704-711, Sep 2011.

SUGASAWA, K. et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. **Mol. Cell**, v. 2, n. 2, p. 223-232, Aug 1998.

_____. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. **Genes Dev.**, v. 15, n. 5, p. 507-521, Mar 1 2001.

_____. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. **DNA Repair (Amst)**, v. 1, n. 1, p. 95-107, Jan 22 2002.

SUGIYAMA, S. et al. Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of ACNU, a hydrophilic nitrosourea, in intracranial brain tumor models. **J. Neurooncol.**, v. 82, n. 1, p. 41-47, Mar 2007.

SURYADINATA, R.; SADOWSKI, M.; SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Biosci. Rep.**, v. 30, n. 4, p. 243-255, 2010.

SUZUKI, N. et al. Translesional synthesis past acetylaminofluorene-derived DNA adducts catalyzed by human DNA polymerase kappa and Escherichia coli DNA polymerase IV. **Biochemistry**, v. 40, n. 50, p. 15176-15183, Dec 18 2001.

SZEGEZDI, E. et al. Bcl-2 family on guard at the ER. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 296, n. 5, p. C941-53, May 2009.

TAHIROV, T. H. Structure and Function of Eukaryotic DNA Polymerase delta. **Subcell Biochem.**, v. 62, p. 217-236, 2012.

TAKAHASHI, A. et al. NHEJ Repair Plays a More Important Role than Homologous Recombination Repair in Defining Radiosensitivity after Exposure to High-LET Radiation. **Radiat. Res.**, Aug 12 2014.

TAKEDACHI, A.; SAIJO, M.; TANAKA, K. DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA. **Mol. Cell Biol.**, v. 30, n. 11, p. 2708-2723, Jun 2010.

TAMURA, M. et al. PTEN gene and integrin signaling in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 21, p. 1820-1828, Nov 3 1999.

TANG, J. Y. et al. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. **Mol. Cell**, v. 5, n. 4, p. 737-744, Apr 2000.

TAYLOR, W. R. et al. p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. **Oncogene**, v. 18, n. 2, p. 283-295, Jan 14 1999.

TCGA. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-1068, Oct 23 2008.

THOMA, B. S. et al. 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.

THOMAS, R. P.; RECHT, L.; NAGPAL, S. Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. **Clin. Pharmacol.**, v. 5, p. 1-9, 2013.

TONG, W. P.; KIRK, M. C.; LUDLUM, D. B. Molecular pharmacology of the haloethyl nitrosoureas: formation of 6-hydroxyethylguanine in DNA treated with BCNU (N,N1-bis[2-chloroethyl]-N-nitrosourea). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 100, n. 1, p. 351-357, May 15 1981.

_____. Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. **Cancer Res.**, v. 42, n. 8, p. 3102-3105, Aug 1982.

TOORCHEN, D.; TOPAL, M. D. Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. **Carcinogenesis**, v. 4, n. 12, p. 1591-1597, Dec 1983.

TORNALETTI, S. DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 6, p. 1010-1012, Mar 2009.

USANOVA, S. et al. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. **Mol. Cancer**, v. 9, p. 248, 2010.

VAISMAN, A. et al. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η . **Biochemistry**, v. 39, n. 16, p. 4575-4580, Apr 25 2000.

VAN DEN BOOM, V. et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. **J. Cell Biol.**, v. 166, n. 1, p. 27-36, Jul 5 2004.

VAN HERREWEGHE, F. et al. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 10, p. 1567-1579, May 2010.

VANGESTEL, C. et al. Forcing cancer cells to commit suicide. **Cancer Biother. Radiopharm**, v. 24, n. 4, p. 395-407, Aug 2009.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, Jan 19 2010.

VERMEULEN, W.; FOUSTERI, M. Mammalian transcription-coupled excision repair. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 8, 2013.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 717-728, Jun 14 2012.

VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. p53 : The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. **Nature Education** v. 3, n. 9, 2010.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-431, May 1 2009.

WAGNER, S. et al. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. **Int. J. Cancer**, v. 82, n. 1, p. 12-16, Jul 2 1999.

WALKER, M. D.; STRIKE, T. A.; SHELINE, G. E. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 5, n. 10, p. 1725-1731, Oct 1979.

WANG, H. et al. Analysis of specialized DNA polymerases expression in human gliomas: association with prognostic significance. **Neuro Oncol.**, v. 12, n. 7, p. 679-6786, Jul 2010.

WANG, J. et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 4, p. 761-768, Feb 15 2008.

WATTERS, J. J.; SCHARTNER, J. M.; BADIE, B. Microglia function in brain tumors. **J. Neurosci. Res.**, v. 81, n. 3, p. 447-455, Aug 1 2005.

WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro Oncol.**, v. 15, n. 1, p. 4-27, Jan 2012.

_____. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? **Nat. Rev. Neurol.**, v. 6, n. 1, p. 39-51, Jan 2010.

WENG, M. W. et al. Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 20, p. 6976-6984, Nov 2010.

WESTERMARK, B. The deficient density-dependent growth control of human malignant glioma cells and virus-transformed glia-like cells in culture. **Int. J. Cancer**, v. 12, n. 2, p. 438-451, Sep 15 1973.

WESTERMARK, B.; MAGNUSSON, A.; HELDIN, C. H. Effect of epidermal growth factor on membrane motility and cell locomotion in cultures of human clonal glioma cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 8, n. 2-3, p. 491-507, 1982.

WESTERMARK, B.; PONTEN, J.; HUGOSSON, R. Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.**, v. 81, n. 6, p. 791-805, Nov 1973.

WICK, W. et al. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 18, n. 27, p. 3936-3943, Jul 8 1999.

WIJNHOFEN, S. W. et al. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. **Mutat. Res.**, v. 614, n. 1-2, p. 77-94, Jan 3 2007.

WILSON, T. R.; JOHNSTON, P. G.; LONGLEY, D. B. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 307-319, May 2009.

WIRTZ, S. et al. Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 12, p. 2111-2117, Dec 2010.

WOLFF, S. et al. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. **Cell Res.**, v. 18, n. 7, p. 733-744, Jul 2008.

WU, Y. H. et al. Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. **Oncogene**, v. 26, n. 33, p. 4761-473, Jul 19 2007.

XI, C. H. et al. [Expression study of DNA translesion synthesis genes in human primary glioma]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 89, n. 19, p. 1309-1312, May 19 2009.

XIE, Z. Brain tumor stem cells. **Neurochem. Res.**, v. 34, n. 12, p. 2055-2066, Dec 2009.

YAMAGUCHI, S. et al. The impact of extent of resection and histological subtype on the outcome of adult patients with high-grade gliomas. **Jpn J. Clin. Oncol.**, v. 42, n. 4, p. 270-277, Apr 2009.

YANG, A. et al. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends Genet.**, v. 18, n. 2, p. 90-95, Feb 2002.

_____. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 714-718, Apr 22 1999.

_____. 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, J. et al. XPC epigenetic silence coupled with p53 alteration has a significant impact on bladder cancer outcome. **J. Urol.**, v. 184, n. 1, p. 336-343, Jul 2010.

YANG, M. et al. Associations between XPC expression, genotype, and the risk of head and neck cancer. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 45, n. 4, p. 374-379, May 2005.

YEKEZARE, M.; GOMEZ-GONZALEZ, B.; DIFFLEY, J. F. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. **J. Cell Sci.**, v. 126, n. Pt 6, p. 1297-1306, Mar 15 2013.

YIN, A. H. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 5002-5012, Dec 15 1997.

YUAN, F. et al. Eukaryotic DNA mismatch repair in vitro. **Methods Mol. Biol.**, v. 920, p. 149-162, 2012.

YUAN, X. et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. **Oncogene**, v. 23, n. 58, p. 9392-9400, Dec 16 2004.

YUN, M. H.; HIOM, K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 460-463, May 21 2009.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 7, n. 5, p. 651-658, 2011.

ZAREMBA, T.; CURTIN, N. J. PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 7, n. 5, p. 515-523, Sep 2007.

ZEMSKOVA, M. et al. p53-dependent induction of prostate cancer cell senescence by the PIM1 protein kinase. **Mol. Cancer Res.**, v. 8, n. 8, p. 1126-1141, Aug.

ZHANG, M. et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 27, p. 85, 2008.

ZHANG, X. et al. Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review). **Exp. Ther. Med.**, v. 3, n. 1, p. 9-14, Jan 2012.

ZHANG, Y. et al. Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase ϵ . **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 23, p. 4717-4724, Dec 1 2000.

ZHAO, J. et al. Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 13, p. 4420-4429, Jul 2009.

ZHU, H. et al. Characterization of human DNA polymerase kappa promoter in response to benzo[a]pyrene diol epoxide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 33, n. 2, p. 205-211, Mar 2012.

ZHU, X. D. et al. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. **Mol. Cell**, v. 12, n. 6, p. 1489-1498, Dec 2003.