ANALI DEL MILAGRO BERNABE GARNIQUE

EFEITO DE INIBIDORES DE TELOMERASE SOBRE
CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO HUMANO
E SOBRE CÉLULAS IMORTALIZADAS COM hTERT.

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia
Celular e Desenvolvimento do
Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do
título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia
Celular e Tecidual.

Orientadora: Profa Dra:
Gláucia Maria Machado
Santelli.

Versão Original

RESUMO

Garnique AMB. Efeito de inibidores de telomerase sobre células tumorais de pulmão humano e sobre células imortalizadas com hTERT. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O telômero é uma sequência repetitiva da dupla cadeia do DNA que protege as pontas dos cromossomos. Seu comprimento é mantido pela telomerase, cuja expressão ocorre em células de câncer, mas não em células somáticas. A célula apresenta um número definido de divisões antes do telômero sofrer erosão. A quebra do DNA ativa a p53, supressor tumoral que induz senescência e respostas de pontos de checagem. O desenvolvimento de inibidores de telomerase tem importância clínica para o câncer. Estudamos os efeitos dos inibidores de telomerase. Duas linhagens celulares LC-HK2 (NSCLC) e hTERT RPE-1 foram tratadas com os inibidores TMPyP4 (5 μ M) e Thymoquinone (10 e 40 μ M) durante 72 e 120 h. TMPyP4 aumentou a porcentagem de células com dano na membrana, induziu mudança na morfologia da célula e diminuiu a expressão do mRNA da vimentina e vinculina. Thymoquinone aumentou a frequência de células senescentes, células com dano na membrana e induziu morte celular. Ambos os inibidores diminuíram a atividade da telomerase, afetando a proliferação e induzindo morte celular.

Palavras Chaves: Adesão celular, inibidores de telomerase, senescência celular, telomerase, telômero.

ABSTRACT

Garnique AMB. Effect of telomerase inhibitors on human lung tumor cells and on cells immortalized with hTERT. [Dissertation (Master Thesis in Tissue and Cell Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

The telomere is a repetitive double-strand sequence of DNA that protects the chromosomes ends. Its length is maintained by telomerase, whose expression occurs in cancer cells, but not in somatic cells. The cell has a defined number of divisions before the telomere undergoes erosion. DNA break activates p53, tumor suppressor and induces senescence and checkpoint responses. The development of telomerase inhibitors is of clinical importance for cancer. We studied the effects of telomerase inhibitors. Two cell lines LC-HK2 (NSCLC) and hTERT RPE-1 were treated with inhibitors TMPyP4 (5 μ M) and Thymoquinone (10 and 40 μ M) for 72 and 120 h. TMPyP4 increased the percentage of cells with membrane damage, induced change in cell morphology, and decreased mRNA expression of vimentin and vinculin. Thymoquinone increased the frequency of senescent cells, cells with membrane damage and induced cell death. Both inhibitors decreased telomerase activity, affecting proliferation and inducing cell death.

Keys words: Cell adhesion, cell senescence, telomerase, telomere, telomerase inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

A descrição dos telômeros foi feita pela primeira vez por Barbara McClintock e por Herman Muller, que estudavam os telômeros em organismos diferentes. Eles perceberam que havia pontas de DNA que se comportavam de forma diferente a aquelas pontas onde existia quebra de DNA, e isso acontecia por que não havia recombinação ou fusão nessas pontas. Assim, o termo telômero foi descrito como sendo “proteções das pontas dos cromossomos” (McClintock, 1941; Wu et al., 2017).

Estudos sobre a possível origem do telômero o descrevem como o resultado de retrotransposons não LTR de uma célula proto-eucariótica originada por endossimbiose (Garavis et al., 2013). A estrutura dos telômeros humanos consiste de repetições de nucleotídeos da sequência TTAGGG, que em diferentes espécies pode ocorrer variações em G ou C, e um complexo de proteínas chamada de Shelterina. Seu papel principal é a manutenção da estabilidade genômica por proteger os cromossomos da fusão ponta-ponta e da degradação exonucleolítica. As pontas dos cromossomos não conseguem ser completamente replicadas pela maquinaria de replicação canônica do DNA, chamado de problema de replicação da ponta. Assim a cada ciclo de divisão de uma célula somática normal na qual o telômero apresenta um comprimento de 5-15 kb, a ponta do telômero perde entre 30 e 200 pb levando ao seu encurtamento. Para exercer sua função de proteção os telômeros podem apresentar duas formas de ‘dobramento’, T-loop e G-quadruplexes, os quais são formados por 150-250 nucleotídeos da ponta solta de cadeia simples 3’ rica em G (Heeg, 2015; Shirgari et al., 2015; Surawera et al., 2016).

Uma célula somática normal apresenta um número limitado de divisões celulares. Com o telômero encurtado a célula entra em um processo chamado de senescência replicativa, em que a célula ainda é viável. Assim, o encurtamento crítico dos telômeros faz com que ocorra a ativação da sinalização de respostas ao dano do DNA (DDR). Isto se dá como resposta a um estado chamado de ‘crise’, o qual ativa as vias de p53 e supressor tumoral Rb que consequentemente param a proliferação celular induzindo genes que promovem a parada na fase G1 e a célula poderá ser encaminhada à morte. (Cesare et al., 2013; Davaadelger et al., 2014; Arnoult, Karseler., 2015).

Estudos revelaram que o encurtamento do telômero, e como consequência a senescência da célula, seria a primeira barreira contra a transformação tumoral. Telômeros, ao se tornarem disfuncionais por chegarem a um comprimento crítico, fazem com que a célula seja encaminhada para a morte, representando a segunda barreira contra a transformação tumoral. Estudos realizados com fibroblastos mostraram que após passarem a senescência, os telômeros muito curtos sofrem fusão pela perda da proteção dos cromossomos, causando assim parada

mitótica e as células são encaminhadas para morte celular (Cesare, Karlseder., 2012; Cesare et al., 2013; Arnoult, Karseler., 2015).

Essa é uma pausa preventiva, pois com a perda dos telômeros pode ocorrer fusão entre uma ponta e a outra dos cromossomos. Cromossomos fusionados não conseguem ser separados corretamente durante a mitose dando lugar a eventos de quebra, fusão e reparo o que pode desencadear perda da estabilidade genômica (Arnoult, Karseler, 2015).

A perda da estabilidade genômica tem sido reconhecida como um marcador de células de câncer, já que seria a responsável pela formação de células com conteúdo diferente do diploide, ou por diferentes rearranjos cromossômicos os quais poderiam resultar em uma célula com vantagens proliferativas (Graham, Meeker, 2017). Estudos correlacionaram pacientes com erosão e disfunção do telômero a um pobre prognóstico de vida, assim como ao aumento da instabilidade genética ao longo da progressão do tumor (Lin et al., 2010).

As vantagens proliferativas que a célula pode chegar a ter são pela ativação de duas vias diferentes, uma é pela ativação da telomerase e a outra pela ativação da via ALT (alongamento alternativo do telômero) (Graham, Meeker, 2017). A telomerase ativa é encontrada na maioria dos carcinomas, enquanto que em sarcomas e outros tumores de origem mesenquimal o mais frequente é a ativação da via ALT (Heeg, 2015).

A ativação da telomerase é encontrada em aproximadamente 90% dos tipos celulares de câncer. A telomerase consiste de dois componentes principais, uma proteína catalítica, a transcriptase reversa da telomerase (TERT), e um componente que funciona como molde para a transcriptase, a RNA telomerase (TERC ou hTR). Outros componentes da telomerase são as proteínas: TEP1 (proteína associada à telomerase), *dyskerin*, p23, e a chaperona Hsp90 (Chang, 2002; Heeg, 2015; Graham, Meeker, 2017; Jaiswal et al., 2017). Quando a telomerase é ativada, ela se liga à ponta solta 3' e começa a alongar o telômero, mantendo-o dessa forma em um comprimento estável, impedindo que a célula ative a via DDR (Resposta de dano ao DNA). (Arnoult, Karseler 2015).

Com a ativação da telomerase a célula deixa de passar para a senescência. A senescência é um processo importante com o qual o equilíbrio da população celular pode ser estabelecido, este processo é considerado um importante mecanismo supressor tumoral. A senescência da célula pode ser causada pelo encurtamento do telômero, por dano ao DNA ou por estresse oxidativo. Além disso, apresenta características únicas como parada irreversível da proliferação celular, resistência a estímulos mitogênicos e oncogênicos, formato alongado e achatado, aumento da expressão de alguns biomarcadores de senescência tais como a proteína p63 relacionada à p53, coloração positiva da atividade da β -Galactosidase associada à senescência,

aumento na expressão da p53, p21, p16 e outros inibidores de quinase dependentes de ciclina, acúmulo de lisossomos, vacuolização e remodelamento da cromatina com formação de focos de heterocromatina, ou seja, senescência associada a focos de heterocromatina ou SAHF (Keyes et al., 2005; Litwiniec et al., 2013; Rufini et al., 2013; Bernhart et al., 2014; Chen et al., 2017). Estas características não as distinguem somente das células proliferativas, mas também de células em quiescência e de células totalmente diferenciadas (Kosar et al., 2011).

Diferentes estudos são realizados com a finalidade de inibir a atividade da telomerase e induzir senescência em células de câncer. Chen e colaboradores (2017) trataram linhagens de células de câncer de pulmão com *Pterostilbene* (*trans-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene*, Pt), e observaram seu potencial como um agente indutor de senescência. Eles encontraram que o tratamento com Pt em baixas doses para o ciclo celular na fase S, o qual pode ser uma característica de senescência e que o tratamento também resultou na desregulação dos níveis da hTERT diminuindo a atividade da telomerase em células p53 positivas, que levou a uma diminuição no tamanho do tumor e a apoptose das células tumorais (Chen et al., 2017). Em células de glioma *in vivo* e *in vitro* o silenciamento da Proteína Quinase D (PRKD), uma proteína implicada na proliferação, migração, invasão e oncogênese, resultou na indução de células senescentes por via dependente e independente da p53 (Bernhart et al., 2014). Juntos, estes achados indicam que a senescência de uma célula tumoral pode ser induzida tanto em células que apresentam a p53 funcional como naquelas que não a tenham.

Outros estudos mostraram que células com fenótipo senescente podem sofrer reversão. Isto foi visto em fibroblastos humanos pelo grupo de Lee em 2015, que trataram fibroblastos senescentes com *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA) por 8 h. Viram mudança na morfologia senescente, assim como reversão do fenótipo senescente, reentrada no ciclo celular e proliferação, por meio da ativação da família de proteínas PKC. (Lee et al., 2015; Lee et al., 2016). Portanto, é importante conhecer o mecanismo de senescência em células tumorais e também em células normais que podem sofrer senescência precoce, como acontece em algumas outras doenças, com a finalidade de encontrar um alvo para futuras terapias visando a indução de senescência em células tumorais que fogem desse processo.

Um marcador importante de células de câncer e que em muitos estudos é considerado como o causador dele é um estado conhecido como tetraploidia. Células tetraploides são células que contêm o dobro da quantidade de DNA de uma célula diploide normal, e contribuem ao desenvolvimento do tumor, aumento da aneuploidia em células de câncer e resistência à terapia e à radiação. Três mecanismos que levam à tetraploidia têm sido observados: fusão celular, falha ao completar a mitose e falha na citocinese (Davoli et al., 2010; Davaadelger et al., 2014).

A tetraploidia tem sido observada nos primeiros estágios de carcinogênese cervical e em uma condição pré-maligna chamada de esôfago de Barrett, neste estudo as células tetraploides têm sido associadas com a perda da p53 e deleção. A tetraploidia pode surgir nos primeiros estágios da tumorigênese, durante o período de disfunção do telômero e antes da ativação da telomerase em células somáticas, relacionando-se dessa forma ao aumento da instabilidade cromossômica (CIN) (Davioli et al., 2010; Pampalona et al., 2012; Heeg 2015; Meena et al., 2015).

Em 1914 o fisiologista Alexandre Theodore Boveri foi quem pela primeira vez associou a aneuploidia a células de câncer, mas ela também tem sido descrita em células saudáveis, tais como em células nervosas em que o estado aneuploide é importante durante o seu desenvolvimento. Também foi encontrado em células sanguíneas, em células de pele e citotrofoblastos (Conlin et al., 2010; Duncan et al., 2012; Davoli et al., 2011).

A aneuploidia se refere ao conteúdo de DNA diferente do diploide normal ou ao ganho ou perda de cromossomos inteiros ou parte deles, ou seja, ao estado do cariótipo. Alguns autores acreditam que a aneuploidia seria a responsável pelo crescimento, desenvolvimento e pela capacidade do tumor se adaptar. Estudos realizados em camundongos mostraram que a indução de aneuploidia leva ao surgimento tumoral. É estimado que cerca de 90% dos tumores sólidos e mais de 50% dos tumores sanguíneos apresentam aneuploidia (Beroukhim et al., 2010; Duncan et al., 2012; Varetti et al., 2014; Foijer et al., 2014)

CIN é um dos fatores que desencadeariam a indução de aneuploidia e a tumorigênese por elevar a taxa de segregação incorreta dos cromossomos, podendo ser de cromossomos intatos, pedaços deles ou cromossomos inteiros, por geração. Vista de uma forma mais ampla, a CIN se refere a alterações estruturais de cromossomos, tais como pontes cromossômicas ou por fragmentos de cromossômicos acêntricos formados por ligações merotéticas. A CIN seria a taxa de ganho ou perda de cromossomos que é encontrada nas linhagens celulares (Ganem et al., 2009; Varetti et al., 2014).

Existem quatro mecanismos que levariam ao surgimento e relação entre CIN e aneuploidia, estes mecanismos incluem falhas no SAC (no ponto de checagem da montagem do fuso), geometria anormal do fuso mitótico, ligação anormal do cromossomo ao cinetócoro e defeitos na coesão de cromátides irmãs.

Defeitos no SAC levariam à CIN aumentando-se assim a proporção de células aneuploides formadas. O SAC é um mecanismo conservado que está presente em todos os eucariotos e é altamente sensível ao estado em que os cinetócoros se ligam aos microtúbulos, encarregando-se de parar a progressão no ciclo até que todos os cromossomos estejam ligados

de forma correta ao fuso mitótico, ele também é requerido na segregação cromossômica. As proteínas do SAC constituem uma cascata de sinalização que engloba as proteínas do fuso monopolar 1 (Mps1), Bud, Mad, CenpE e RZZ. As proteínas MAD2 e BURB1, quando ativadas, encarregam-se de inibir a ação da Ubiquitina ligase E3. Ela é um complexo de multiproteínas, o Complexo Ciclosomo Promotor da Anáfase (APC/C) que tem como alvo de degradação proteínas chaves que controlam a progressão do ciclo celular. (Rudner et al., 1996; Foijer et al., 2014; Varette et al., 2014; Chan et al., 2016; Henze et al., 2017; Varadkar et al., 2017).

As proteínas do SAC formam um complexo chamado complexo de ponto de checagem mitótico (MCC) que é o responsável por manter o APC/C inativo. As proteínas do MCC são os co-ativadores Cdc20, Mad2, Bub3 e BubR1 e encarregam-se de evitar a progressão na anáfase. Após a correta ligação das cromátides ao cinetócoro estas proteínas são removidas ativando desse modo o APC/C. Ele se encarrega de ubiquitinar as proteínas Securina e Ciclina B. A Securina atua inibindo a ação da Separase. A Separase se encarrega de clivar a Coesina, que é a encarregada de manter ligadas as cromátides irmãs. Assim mesmo, com a ubiquitinação do anel de Ciclina B, a proteína Cdk1 pode ser liberada o que permite a saída da mitose. (Davoli et al., 2011; Foijer et al., 2014; Zhang, Galardy, 2015; Chan et al., 2016).

Diferentes estudos mostram a importância dos componentes do MCC para uma correta segregação dos cromossomos, como o realizado em camundongos com alelos hipomórficos para Cdc2, neste estudo eles observaram aumento na formação de pontes cromossômicas e alinhamento incorreto dos cromossomos que resultou na formação de células aneuploides. Mesmo assim outros estudos mostraram que mutações nos genes do SAC não são frequentes nas células de câncer humanas (Malureanu et al., 2010; Valerti et al., 2014; Zhang, Galardy, 2015). Outros estudos relacionaram o surgimento e o aumento da CIN com a super-expressão da Mad2 em camundongos. Foi observado que a super-expressão da Mad2 *per se*, não é suficiente para induzir aumento na aneuploidia e crescimento do tumor, e que outros erros em diferentes proteínas do SAC são necessários para esse efeito (Sotillo et al., 2010; Chan et al., 2016). Portanto, diferentes mutações seriam necessárias para alcançar um aumento na CIN e consequentemente a aneuploidia. Uma única proteína do SAC mutada não é suficiente para aumentar a aneuploidia e levar à transformação tumoral.

Alguns erros na ligação dos cromossomos aos cinetócoros não são notados pelo SAC, como por exemplo a ligação merotética, a qual é referida como uma anormalidade da ligação entre o microtúbulo e o cinetócoro. Que ocorre quando um único cromossomo é ligado a duas fibras do fuso, e forças opostas atuando durante a separação causam cromossomos tardios que podem resultar em uma incorreta segregação nas células filhas, levando ao surgimento de

aneuploidia. A hiperestabilização da ligação microtúlo-cinetocoro também é um problema que pode causar erros durante a segregação cromossômica (Bakhoun et al., 2009; Varette et al., 2014; Zhang, Galardy., 2015). Outros estudos mostram que mesmo com algumas falhas durante as ligações dos cromossomos ao fuso o SAC não é ativado, como o estudo realizado por Chan e colaboradores (2016) onde observaram que ao tratar células com baixas doses de agentes desestabilizantes de microtúbulos induziram a formação de células aneuploides (Chan et al., 2016).

Um evento que está correlacionado diretamente ao aumento de ligações merotéticas é a amplificação centrossômica. O estudo realizado por Ganem e colaboradores indicou que a amplificação centrossômica pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento de CIN (Ganem et al., 2009). Ela ocorre quando uma célula adquire mais de um par de centrossomos, isto ocorreria frequentemente em células de câncer podendo gerar fusos multipolares, falhas na divisão e fusão celular. (Ganem et al., 2009; Holland, Cleveland, 2012; Varette et al., 2014). Estudos em camundongos transgênicos que tiveram um aumento drástico no número de centrossomos mostraram que isto causa aumento do tumor no modelo de neoplasia intestinal, resultando em aumento de células aneuploides e no surgimento de tumores espontâneos em diferentes tecidos (Levine et al., 2017).

Outro evento que pode levar à aneuploidia é o erro na coesão de cromátides irmãs. Isto pode ocorrer quando há uma perda prematura na coesão das cromátides irmãs e/ou pela persistência do erro até as posteriores anáfases, podendo levar à segregação errada dos cromossomos (Holland, Cleveland, 2012; Ricke, van Deursen, 2013; Lin et al., 2016). Para o processo de coesão de cromátides irmãs um complexo multiproteico é importante, ele é o complexo de Coesina que é composto por quatro subunidades proteicas: SMC1A, SMC3, RAD21, e STAG1 ou STAG2 que seguram fisicamente as cromátides irmãs. Têm sido realizados diferentes estudos onde foi observado que qualquer mutação em algumas das subunidades pode levar a erros na coesão e consequentemente levar ao aumento de aneuploidia. O estudo realizado por Kim e colaboradores (2017) em tumores que tinham o STAG2 mutado mostrou que as mutações por si só não são os únicos responsáveis por erros durante a coesão das cromátides irmãs, mas que também é necessária a inativação completa do gene (Holland, Cleveland, 2012; Varette et al., 2014; Kim et al., 2017).

Portanto, diferentes estudos têm sido feitos tendo como finalidade entender a relação entre a CIN e a aneuploidia e a importância de cada uma como um evento que precederia a transformação maligna, sendo que até o momento não tem sido mostrado que nenhum dos dois por si só seja o responsável por desencadear transformação tumoral. Os estudos têm mostrado

que os eventos não são só isolados e que seriam um conjunto de eventos interligados precedendo a transformação.

Como foi observado até o momento, falhas durante a divisão celular podem causar tetraploidia, aneuploidia e aumento na CIN (Varetti et al., 2014; Meena et al., 2015). Erros durante a citocinese podem ocorrer devido à erosão do telômero, por replicação incompleta do DNA ou ainda por cromossomos concatenados. A erosão do telômero pode ser devido a estresse de replicação induzido por oncogenes ou por crise telomérica. Ela pode também desencadear um processo chamado de fusão das pontas, quando o DNA fica desprotegido e ocorre quebra da dupla fita, isto leva à ativação de pontos de checagem e de vias de combinação e reparo, como a maquinaria de reparo de quebra da dupla fita de DNA (DSB) que é ativada desencadeando eventos de fusão, quebra e reparo (Longhese, 2008; Fenech et al., 2011; Lim, Ganem., 2016; Pampalona et al., 2016).

Esses eventos de fusão, quebra e reparo são os responsáveis pela formação de cromossomos dicêntricos, isto é, cromossomos que apresentam dois centrômeros. Durante a divisão celular, cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos da célula resultando na formação de pontes cromossômicas ou de anáfase (Stimpson et al., 2010; Hayashi, Karlseder, 2013). Durante a citocinese esses cromossomos que se atrasam podem ser reparados e assim a citocinese continua normalmente, mas eles também poder se acumular e induzir ruptura do envelope nuclear. Na ausência de quebra da ponte de anáfase, a membrana nuclear circunda as células filhas e a ponte de anáfase é formada podendo aumentar a população de células poliploides (Fenech et al., 2011; Maciejowski et al., 2015; Pampalona et al., 2012; Varetti et al., 2014).

Diferentes estudos realizados mostram a relação entre o aumento da formação de pontes de anáfase pelo aumento de rearranjos cromossômicos assim como pelo aumento de células aneuploides e da CIN, pois a formação de pontes de anáfase pode contribuir para o início do tumor (Pampalona et al., 2012).

1.1 O papel dos G- Quadruplexes

O DNA telomérico, como foi dito antes, consiste de repetições em *tandem* da sequência TTAGGG, e contém proteínas associadas tais como o complexo Shelterina. Este complexo apresenta as subunidades TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 e RAP1 encarregadas de manter a homeostase do comprimento do telômero evitando que a maquinaria DDR seja ativada de forma inapropriada (Lin et al., 2013; Ivancich et al., 2016). A perda da proteção da ponta do telômero

leva à disfunção telomérica, caracterizada por fusão ponta-ponta, recombinação, formação de pontes de anáfase e exposição da ponta solta 3' que levariam à ativação de pontos de checagem que encaminhariam a célula para senescência e morte (Li et al., 2013; De Lange, 2009; Zhou et al., 2016).

A ponta do telômero ao se dobrar forma uma estrutura chamada de G-quadruplexes (G4), encontrado não somente na ponta do telômero, mas também em outras regiões importantes como em promotores oncogênicos (regiões intra-cromossômicas). Esta estrutura é particularmente formada por Guaninas e é graças à sua capacidade de se dobrar e manter ligações do tipo Hoogsteen que podem se formar G-quadruplexes. Estudos mostraram a formação de G4 em células humanas assim como sua modulação dependendo da fase do ciclo celular e seu aumento na fase S (Murat et al., 2011, Biffi et al., 2013; Lin et al., 2013).

A telomerase atua se ligando na ponta 3' solta do telômero, ao ter sua subunidade hTR complementar, que em linhagens celulares tumorais encontra-se ativa, ela começa a alongar o telômero, evitando assim seu excessivo encurtamento. Além disso, tem sido visto que em células onde a atividade da telomerase foi inibida ocorre a ativação da via de comprimento alternativo do telômero (Chang 2002.; Zhou et al 2016.; Siebenmorgen et al., 2017). Por este motivo, compostos que ajudem na estabilização e formação de G-Quadruplexes têm sido alvos de muitos estudos nos últimos anos, com a finalidade de inibir indiretamente a ação da telomerase.

Com a ajuda de análises de bioinformática tem sido identificadas mais de 350.000 sequências candidatas para a formação de estruturas G-Quadruplexes. Elas têm sido relacionadas ao controle de genes envolvidos na carcinogênese tais como c-Myc, c-kit; K-ras e outros. (Balasubramanian et al., 2011; Vorlíčková et al., 2012). A descoberta de que cátions monovalentes como o K^+ e o Na^+ estabilizam estruturas G-quadruplexes fez com que pequenas moléculas sejam estudadas com a finalidade de encontrar novos compostos que tenham a mesma afinidade e a mesma função. Dicroísmo circular, Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) e difração por UV tem sido métodos bastante usados para observar a interação de uma molécula com o DNA, assim dois compostos têm chamado nossa atenção, eles são o TMPyP4 e a Thymoquinone.

O TMPyP4 (*5,10,15,20-tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine*) é uma porfirina catiônica que apresenta uma porção aromática com que o G4 tem afinidade. Diferentes estudos mostraram a interação do TMPyP4 com promotores oncogênicos como c-Myc, K-ras, WT1 e com a diminuição na expressão da hTERT. Assim também foi mostrado seu potencial na

diminuição do tamanho do tumor em camundongos e o prolongamento de suas vidas (Grand et al., 2002; Balasubramanian et al., 2011; Zindanloo et al., 2016).

Estudos *in vitro* mostraram o uso do TMPyP4 como um forte inibidor indireto da telomerase, ao promover inibição da proliferação e morte celular. O estudo realizado por Shammas e colaboradores (2003) que trataram linhagens celulares de mieloma com o composto, mostrou encurtamento do telômero, diminuição da atividade da telomerase, assim como morte celular por apoptose (Shammas et al., 2003). Um outro estudo em células de carcinoma de ovário adicionou ao tratamento com TMPyP4 a chamada terapia fotodinâmica e encontraram que juntos eles promovem supressão na proliferação e motilidade das células, identificaram também atividade apoptótica e antimetastática (Liu et al., 2014). Um estudo recente em células de câncer cervical mostrou inibição da proliferação e apoptose dessas células quando tratadas com diferentes doses do composto (Cheng, Cao, 2017)

No entanto, um outro estudo realizado em 2016 realizou análises por sequenciamento do RNA do genoma inteiro onde encontraram que o composto em baixas doses poderia também ser o responsável por modular genes envolvidos na adesão e migração da célula. Assim, eles observaram aumento na adesão célula-matriz e promoção da migração de células tumorais. Mas também observaram que em altas doses o composto apresenta uma ação diferente que implica na diminuição da proliferação celular assim como a indução de morte (Zheng et al., 2016).

Portanto, diferentes estudos demonstraram a ação do TMPyP4 como um forte modulador e/ou estabilizador da estrutura G4, promovendo diminuição na ação da telomerase, inibição da proliferação celular assim como morte em células tumorais, mas mesmo assim mais estudos são necessários para demonstrar seu papel na modulação de genes que poderiam ajudar as células de câncer aumentando sua capacidade proliferativa e migratória.

O composto *Thymoquinone* (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) é o constituinte principal da *Nigella sativa*, conhecida na Ásia popularmente como “cominho preto”. A *Thymoquinone* tem sido alvo de muitos estudos por sua potente ação antiproliferativa, e indução de morte de células tumorais. O estudo realizado por Gurung e colaboradores (2010), mostrou efeitos como dano ao DNA, desgaste de telômeros pela inibição da telomerase e morte em células de glioblastoma, mostrando-se um composto com alto potencial como agente anti-câncer (Gurung et al., 2010). *Thymoquinone* foi testada em diferentes linhagens de células de câncer e também combinada com a Cisplatina, uma droga quimio terapêutica, resultando em inibição do crescimento do tumor, assim como da invasão de células tumorais e indução de morte por apoptose (Attoub et al., 2013). Tem sido investigado também o papel quimio

preventivo da *thymoquinone* no metabolismo enzimático, apresentando também ação apoptótica, assim como parada do ciclo na fase G2/M (ElKhoely et al., 2015)

Como resultado dos diferentes estudos realizados a *Thymoquinone* apresentaria atividade quimio preventiva e quimio terapêutica, e estas atividades são realizadas pela modulação de diferentes mecanismos vinculados à proliferação, migração e invasão. Um outro mecanismo tem sido investigado e é a possível interação da *Thymoquinone* com as estruturas G-quadruplexes. O trabalho de Salem e colaboradores (2015) mostra como este composto pode interagir com as estruturas G4 por meio da interação com dois sítios de ligação, de uma forma parecida à ligação que faz o composto TMPyP4, inibindo dessa forma a ação da telomerase (Salem et al., 2015).

Assim, mesmo que esses dois compostos que apresentam fortes evidências para sua interação com o G4 sejam bastante estudados, mais estudos são necessários para se conhecer os mecanismos pelos quais os dois compostos estão atuando e seus verdadeiros papéis sobre a ação em células tumorais.

6. CONCLUSÃO

- Nós confirmamos que TMPyP4 e Thymoquinone inibem a atividade da telomerase
- A célula RPE--1 quando tratada com baixas concentrações de *Thymoquinone* é menos afetada que a célula LC-HK2, mas em concentrações maiores do composto ambas células são afetadas com a morte das células.
- *Thymoquinone* no período dos tratamentos que realizamos induziu aumento de células senescentes, assim como parada na fase G1.
- Tanto *Thymoquinone* quanto TMPyP4 induzem morte celular.
- O TMPyP4 apresenta um efeito maior sobre as células LC-HK2 que sobre as células RPE-1. O período de ação do TMPyP4 em relação ao aumento de morte das células é maior que o período da *Thymoquinone*.
- TMPyP4 diminui a expressão da vinculina e da vimentina, que estão relacionadas a processos de adesão e migração.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Arnoult, N, and Jan K. "Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nature structural & molecular biology*. 2015., 22. (11): 859.
- Attoub, S., Sperandio, O., Raza, H., Arafat, K., Al-Salam, S., Al Sultan, M. A., ... & Adem, A. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & clinical pharmacology*, 2013., 27(5): 557-569.
- Badr, G., Mohany, M., & Abu-Tarboush, F. Thymoquinone decreases F-actin polymerization and the proliferation of human multiple myeloma cells by suppressing STAT3 phosphorylation and Bcl2/Bcl-XL expression. *Lipids in health and disease*. 2011., 10(1): 236.
- Bakhoum, SF., Genovese, G., & Compton, DA. Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *Current Biology*. 2009.,19(22): 1937-1942.
- Balasubramanian, S., Hurley, LH., & Neidle, S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?. *Nature reviews. Drug discovery*. 2011., 10(4): 261.
- Bernhart, E., Damm, S., Heffeter, P., Wintersperger, A., Asslaber, M., Frank, S., ... & Eder, H. Silencing of protein kinase D2 induces glioma cell senescence via p53-dependent and-independent pathways. *Neuro-oncology*. 2014., 16(7): 933-945.
- Beroukhi, R., Mermel, CH., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., ... & Mc Henry, KT. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010.,463(7283): 899.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., & Balasubramanian, S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature chemistry*. 2013., 5(3): 182-186.
- de F Bonaldo, M., Pestano, CB., Ribeiro, MCM., Machado-Santelli, GM., Mori, L., & Oliveira, AR. (1991). Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. *Cell biology international reports*. 1991., 15(3): 229-241.
- Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000., 25(2): 169-193.
- Bustin, SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002., 29(1), 23-39.
- Cesare, AJ., & Karlseder, J. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Current opinion in cell biology*. 2012., 24(6), 731-738.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Chan, A., Singh, A.J., Northcote, P.T., & Miller, J.H. Peloruside A, a microtubule-stabilizing agent, induces aneuploidy in ovarian cancer cells. *Investigational new drugs*. 2016., 34(4): 424-438.

Chang, JTC., Chen, YL., Yang, HT., Chen, CY., & Cheng, A.J. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *The FEBS Journal*. 2002., 269(14): 3442-3450.

Chen, R.J., Wu, P.H., Ho, C.T., Pan, M.H., Chen, H.M., Ho, Y.S., & Wang, Y.J. P53-dependent downregulation of hTERT protein expression and telomerase activity induces senescence in lung cancer cells as a result of pterostilbene treatment. *Cell Death and Disease*. 2017., 8(8).

Cheng, M.J., & Cao, Y.G. TMPYP4 exerted antitumor effects in human cervical cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biological research*. 2017., 50(1): 24.

Conlin, L.K., Thiel, B.D., Bonnemann, C.G., Medne, L., Ernst, L.M., Zackai, E.H., ... & Spinner, N.B. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Human molecular genetics*. 2010., 19(7): 1263-1275.

Davaadelger, B., Shen, H., & Maki, C.G. Novel roles for p53 in the genesis and targeting of tetraploid cancer cells. *PloS one*. 2014., 9(11): e110844.

Davoli, T., Denchi, E.L., & de Lange, T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 2010., 141(1): 81-93.

de Lange, T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*. 2009., 326(5955): 948-952.

Duncan, A.W., Newell, A.E.H., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S.B., Thayer, M.J., ... & Grompe, M. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2012., 142(1): 25-28.

ElKhoely, A., Hafez, H.F., Ashmawy, A.M., Badary, O., Abdelaziz, A., Mostafa, A., & Shouman, S.A. Chemopreventive and therapeutic potentials of thymoquinone in HepG2 cells: mechanistic perspectives. *Journal of natural medicines*. 2015., 69(3): 313-323.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., ... & Thomas, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011., 26(1): 125-132.

Foijer, F., Xie, S.Z., Simon, J.E., Bakker, P.L., Conte, N., Davis, S.H., ... & Sorger, P.K. Chromosome instability induced by Mps1 and p53 mutation generates aggressive lymphomas exhibiting aneuploidy-induced stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014., 111(37): 13427-13432.

Fujimori, J., Matsuo, T., Shimose, S., Kubo, T., Ishikawa, M., Yasunaga, Y., & Ochi, M. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. *Journal of Orthopaedic Research*, 2011., 29(11): 1707-1711.

Gali-Muhtasib, HU., Kheir, WGA., Kheir, LA., Darwiche, N., & Crooks, PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*. 2004., 15(4): 389-399.

Garavís, M., González, C., & Villasante, A. On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution. *Genome biology and evolution*. 2013., 5(6): 1142-1150.

Graham, MK., & Meeker, A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nature reviews. Urology*. 2017.

Grand, CL., Han, H., Muñoz, RM., Weitman, S., Von Hoff, DD., Hurley, LH., & Bearss, DJ. The Cationic Porphyrin TMPyP4 Down-Regulates c-MYC and Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression and Inhibits Tumor Growth in Vivo 1 This research was supported by grants from the NIH and the Arizona Disease Control Research Commission. 1. *Molecular cancer therapeutics*. 2002., 1(8): 565-573.

Gurung, RL., Lim, SN., Khaw, A. K., Soon, JFF., Shenoy, K., Ali, SM., ... & Hande, MP. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PLoS One*. 2010., 5(8): e12124.

Havel, L. S., Kline, E. R., Salgueiro, A. M., & Marcus, A. I. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2–Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity. *Oncogene*. 2015., 34(15): 1979-1990.

Hayashi, MT., & Karlseder, J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene*. 2013., 32(39): 4593-4601.

Heeg, S. Variations in telomere maintenance and the role of telomerase inhibition in gastrointestinal cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2015., 8: 171.

Henze, R., Dittrich, P., & Ibrahim, B. A Dynamical Model for Activating and Silencing the Mitotic Checkpoint. *Scientific Reports*. 2017., 7.

Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated β -galactosidase assay. *Biological Aging: Methods and Protocols*. 2017., 21-31.

Ivancich, M., Schrank, Z., Wojdyla, L., Leviskas, B., Kuckovic, A., Sanjali, A., & Puri, N. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants*. 2017., 6(1): 15.

Izard, T., & Brown, D. T. Mechanisms and functions of vinculin interactions with phospholipids at cell adhesion sites. *Journal of Biological Chemistry*. 2016., 291(6): 2548-2555.

Jaiswal, RK., Kumar, P., Sharma, A., Mishra, DK., & Yadava, PK. Proteomic identification of proteins differentially expressed following overexpression of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) in cancer cells. *PloS one*. 2017., 12(7): e0181027.

Keyes, WM., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, SW., & Mills, A. A. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes & development*. 2005., 19(17): 1986-1999.

Kim, JS., He, X., Orr, B., Wutz, G., Hill, V., Peters, J. M., ... & Waldman, T. Intact cohesion, anaphase, and chromosome segregation in human cells harboring tumor-derived mutations in STAG2. *PLoS genetics*. 2016., 12(2): e1005865.

Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., & Bartek, J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle*. 2011., 10(3): 457-468.

Kundu, J., Chun, K. S., Aruoma, O. I., & Kundu, J. K. Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014., 768, 22-34.

Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P. J., & de Lange, T. Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis. *Cell*. 2015, 163(7): 1641-1654.

Malureanu, L., Jeganathan, KB., Jin, F., Baker, DJ., Van Ree, JH., Gullon, O., ... & Van Deursen, JM. Cdc20 hypomorphic mice fail to counteract de novo synthesis of cyclin B1 in mitosis. *The Journal of cell biology*. 2010., 191(2): 313-329.

Meena, JK., Cerutti, A., Beichler, C., Morita, Y., Bruhn, C., Kumar, M., ... & di Fagagna, FDA. Telomerase abrogates aneuploidy-induced telomere replication stress, senescence and cell depletion. *The EMBO journal*. 2015., 34(10): 1371-1384.

McClintock, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*. 1941., 26(2): 234.

Murat, P., Singh, Y., & Defrancq, E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chemical Society Reviews*. 2011., 40(11): 5293-5307.

Lee, YY., Kim, HS., & Lim, IK. Downregulation of PEA-15 reverses G1 arrest, and nuclear and chromatin changes of senescence phenotype via pErk1/2 translocation to nuclei. *Cellular signaling*. 2015., 27(6): 1102-1109.

Lee, YY., Ryu, MS., Kim, HS., Suganuma, M., Song, KY., & Lim, IK. Regulations of reversal of senescence by PKC isozymes in response to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate via nuclear translocation of pErk1/2. *Molecules and cells*. 2016., 39(3): 266.

Levine, MS., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., Vitre, B., ... & Foijer, F. Centrosome amplification is sufficient to promote spontaneous tumorigenesis in mammals. *Developmental Cell*. 2017., 40(3): 313-322.

Li, GZ., Eller, MS., Firoozabadi, R., & Gilchrest, BA. Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003., 100(2): 527-531.

Lim, S., & Ganem, N. J. Tetraploidy and tumor development. *Oncotarget*. 2014., 5(22): 10959.

Lin, TT., Letsolo, B. T., Jones, R. E., Rowson, J., Pratt, G., Hewamana, S., ... & Baird, D. M. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood*. 2010., 116(11): 1899-1907.

Lin, W., Sampathi, S., Dai, H., Liu, C., Zhou, M., Hu, J., ... & Chai, W. Mammalian DNA2 helicase/nuclease cleaves G-quadruplex DNA and is required for telomere integrity. *The EMBO journal*. 2013., 32(10): 1425-1439.

Litwiniec, A., Gackowska, L., Helmin-Basa, A., Żuryń, A., & Grzanka, A. Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin. *Cancer cell international*. 2013., 13(1): 9.

Liu, CY., Lin, HH., Tang, MJ., & Wang, YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015., 6(18): 15966.

Liu, H., Lv, C., Ding, B., Wang, J., Li, S., & Zhang, Y. Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 with photodynamic therapy in ovarian carcinoma cells. *Oncology letters*. 2014., 8(1): 409-413.

Longhese, MP. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes & development*. 2008., 22(2): 125-140.

Pampalona, J., Frías, C., Genescà, A., & Tusell, L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS genetics*. 2012., 8(4): e1002679.

Pampalona, J., Roscioli, E., Silkworth, WT., Bowden, B., Genescà, A., Tusell, L., & Cimini, D. Chromosome bridges maintain kinetochore-microtubule attachment throughout mitosis and rarely break during anaphase. *PloS one*. 2016., 11(1): e0147420.

Park, E. J., Chauhan, A. K., Min, K. J., Park, D. C., & Kwon, T. K. Thymoquinone induces apoptosis through downregulation of c-FLIP and Bcl-2 in renal carcinoma Caki cells. *Oncology reports*. 2016., 36(4): 2261-2267.

Relles, D., Chipitsyna, G. I., Gong, Q., Yeo, C. J., & Arafat, H. A. Thymoquinone Promotes Pancreatic Cancer Cell Death and Reduction of Tumor Size through Combined Inhibition of Histone Deacetylation and Induction of Histone Acetylation. *Advances in preventive medicine*, 2016.

Rudner, AD., & Murray, AW. The spindle assembly checkpoint. *Current opinion in cell biology*. 1996., 8(6): 773-780.

Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 2013., 32(43): 5129.

Salem, AA., El Haty, IA., Abdou, IM., & Mu, Y. Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: a possible mechanism for thymoquinone anticancer effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2015., 1850(2): 329-342.

Shammas, MA., Reis, RJS., Akiyama, M., Koley, H., Chauhan, D., Hideshima, T., ... & Munshi, NC. Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*. 2003., 2(9): 825-833.

Sharpless, N. E., & DePinho, R. A. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2004., 113(2): 160.

Shirgahi Talari, F., Bagherzadeh, K., Golestanian, S., Jarstfer, M., & Amanlou, M. Potent human telomerase inhibitors: molecular dynamic simulations, multiple pharmacophore-based virtual screening, and biochemical assays. *Journal of chemical information and modeling*. 2015., 55(12): 2596-2610.

Siebenmorgen, T., & Zacharias, M. Origin of Ion Specificity of Telomeric DNA G-Quadruplexes Investigated by Free-Energy Simulations. *Biophysical Journal*. 2017., 112(11): 2280-2290.

Sotillo, R., Schvartzman, JM., Socci, ND., & Benezra, R. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumor relapse after oncogene withdrawal. *Nature*. 2010., 464(7287): 436.

Stenberg, H; Timiras, SP. *Studies of Aging: Protocols*. Springer Berlin Heidelberg. 1999., p.140.

Stimpson, KM., Song, IY., Jauch, A., Holtgreve-Grez, H., Hayden, KE., Bridger, JM., & Sullivan, B. A. Telomere disruption results in non-random formation of de novo dicentric chromosomes involving acrocentric human chromosomes. *PLoS genetics*. 2010., 6(8): e1001061.

Suraweera, N., Mouradov, D., Li, S., Jorissen, RN., Hampson, D., Ghosh, A., ... & Aleva, F. Relative telomere lengths in tumor and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016., 7(24): 36474.

Trevor, K. T., McGuire, J. G., & Leonova, E. V. Association of vimentin intermediate filaments with the centrosome. *Journal of cell science*. 1995., 108(1): 343-356

Varadkar, P., Abbasi, F., Takeda, K., Dyson, JJ., & McCright, B. PP2A-B56γ is Required for an Efficient Spindle Assembly Checkpoint. *Cell Cycle*. 2017., (just-accepted): 00-00.

Varetti, G., Pellman, D., & Gordon, D. J. Aurea mediocritas: the importance of a balanced genome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014., 6(11): a015842.

Vorlíčková, M., Kejnovská, I., Sagi, J., Renčíuk, D., Bednářová, K., Motlová, J., & Kypr, J. Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*. 2012., 57(1): 64-75.

Wu, RA., Upton, HE., Vogan, JM., & Collins, K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 2017.

Zhang, Y., & Galaray, PJ. Ubiquitin, the centrosome, and chromosome segregation. *Chromosome research*. 2016., 24(1): 77-91.

Zheng, XH., Nie, X., Liu, HY., Fang, YM., Zhao, Y., & Xia, LX. TMPyP4 promotes cancer cell migration at low doses, but induces cell death at high doses. *Scientific reports*. 2016., 6: 26592.

Zhou, G., Liu, X., Li, Y., Xu, S., Ma, C., Wu, X., ... & Chen, Y. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2016., 7(12): 14925-14939.

Zidanloo, SG., Colagar, AH., Ayatollahi, H., & Raoof, JB. Downregulation of the WT1 gene expression via TMPyP4 stabilization of promoter G-quadruplexes in leukemia cells. *Tumor Biology*. 2016., 37(7): 9967-9977.