CAMILA BELFORT PIANTINO

**Análise do efeito do Prima-1 na expressão dos genes
envolvidos na morte celular programada em linhagens de
câncer de bexiga**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Urologia

Orientador: Prof^a. Dra. Katia Ramos Moreira Leite

Co-orientador: Prof^o. Dr. Alberto Azoubel Antunes

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Piantino, Camila Belfort

Análise do efeito do Prima-1 na expressão dos genes envolvidos na morte celular programada em linhagens de câncer de bexiga / Camila Belfort Piantino. -- São Paulo, 2012.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Urologia.

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Co-orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.Neoplasias urológicas 2.Carcinoma urotelial de bexiga 3.p53
4.Apoptose 5.Prima-1

USP/FM/DBD-185/12

“A **Deus**, aos meus pais **Neide** e **Guido** e ao meu querido **avô Baiano** o qual nos deixou e não pode presenciar este momento”

Agradecimentos

A minha querida orientadora, **Prof^a. Dra. Katia Ramos Moreira Leite**, pela grande oportunidade a mim concedida de desenvolver este trabalho sob sua brilhante orientação. Agradeço por toda compreensão e por permitir que eu iniciasse minha carreira acadêmica em paralelo ao desenvolvimento deste projeto. Sinto um carinho imenso por você e serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim!

Ao **Prof^o. Dr. Miguel Srougi**, um dos melhores seres humanos que já conheci. Pessoa de caráter incontestável! Agradeço pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo carinho e auxílio inestimável durante este percurso.

Ao **Prof^o. Dr. Alberto Azoubel Antunes**, co-orientador deste trabalho, pelo carinho e amizade!

A **Dra. Sabrina Reis**, uma das grandes responsáveis por este momento. Obrigada pela confiança e amizade dedicada ao longo destes anos!

Aos meus queridos amigos do **LIM 55**, **Dra. Betina Katz**, **Caio Moura**, **Cláudia Hemza**, **Denis Reis**, **Iran Amorim Silva**, **Dr. José Pontes**, **Luciana Sevo**, **Manuel García**, **Michele Rodrigues**, **Nayara Viana**, **Dr. Nelson Dip**, por terem tornado meus dias de trabalho mais alegres e pela preciosa ajuda.

A equipe do **Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês**, em especial à **Dra. Juliana Canavez**, por tudo que me ensinou ao longo destes anos.

A todos os colegas da clínica urológica, em especial ao **Prof^o. Dr. Homero Bruschini** e as secretárias da Urologia **Ionis**, **Elisa** e **Inisabete**, pela prestatividade.

A **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado 09/52593-0.

A **FAPESP** pelo auxílio pesquisa 09/52555-0.

Aos meus queridos pais, **Neide e Guido**, pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos. Meu porto seguro, meus maiores exemplos de honestidade e garra. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Danilo**, pelo companheirismo e amizade sincera!

Ao meu amado, **Eduardo**, por estar ao meu lado desde o início desta caminhada. Pelo incentivo e apoio e por me mostrar a cada dia que não existe distância diante de um verdadeiro amor!

A **Deus** por me permitir vivenciar este momento e por todas as bênçãos que tem derramado sobre mim.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Referências: adaptado de Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	15
1.1	Câncer de Bexiga	15
1.2	Apoptose.....	18
1.2.1	Apoptose induzida por <i>p53</i>	20
1.3	Mutação no <i>p53</i>	24
1.4	<i>p53</i> como alvo farmacológico	25
1.5	Prima-1	26
2	Objetivos	29
2.1	Objetivo primário	29
2.2	Objetivos secundários	29
3	Material e Métodos	31
3.1	Linhagens Celulares e Tratamento	31
3.2	Análise do perfil de expressão dos genes Puma, Noxa, Bak, Bax, Citocromo-c, Apaf-1, Casp2, Casp3, Casp7, Casp9, p21, MDM2 e <i>p53</i>	32
3.2.1	Extração do RNA total	32
3.2.2	Transcrição reversa (RT).....	33
3.2.3	Análise da expressão por qRT-PCR	33

3.3 Análise do potencial da membrana mitocondrial	35
3.4 Avaliação da apoptose	36
4 Resultados	38
4.1 Perfil de expressão gênica.....	38
4.1.2 Prima-1 e apoptose	41
4.1.3 Prima-1 e ativação do <i>p53</i>	42
4.2 Análise do potencial da membrana mitocondrial	42
4.3 Análises morfológicas	44
5 Discussão.....	46
6 Perspectivas Futuras	54
7 Referências Bibliográficas.....	56
8 Apêndice	67

Lista de Abreviaturas

ATCC - *American Tissue Cell Culture*

ECACC - *European Collection of Cell Cultures*

CUB - Carcinoma urotelial da bexiga

FGFR3 - Fator de crescimento de fibroblasto

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

P53 - Proteína P53

p53 – Gene *p53*

PRIMA-1 - *p53 reactivation and initiation of massive apoptosis-1*

MIRA-1 - *mutant p53 reactivation and induction of rapid apoptosis*

Rb- Proteína do retinoblastoma

FISH - Hibridização *in situ* por fluorescência

RTU - Ressecção transuretral da bexiga

BC – *bladder cancer*

BCG - *Bacilo Calmette-Guérin*

ded - *Death effector domain*

cad - *Caspase recruitment domain*

WT - *Wild-type*

Mt - mutado

RE – Elemento de resposta

Apaf-1- Fator de ativação da protease

SFB – Soro fetal bovino

BH - Domínios de homologia

Bcl-2 - (B-cell lymphoma 2)

Casp – caspases

qRT-PCR - *quantitative reverse transcriptase PCR*

RTU - ressecção transuretral

RT- transcrição reversa

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos sinais envolvidos na via intrínseca mediada por *p53* 22

Figura 2. Heterogeneidade das vias envolvidas na inativação de *p53* em cânceres humanos: (<http://p53.free.fr>). 23

Figura 3 – Perfil de expressão dos genes Puma, Noxa, Bak, Bax, Citocromo-c, Apaf-1, Casp9, Casp7, Casp3, Casp2, p21, MDM2 e *p53*, nas linhagens RT4 (*p53* wt) e T24 (*p53* mt) após exposição a radiação UVC e tratamento com Prima-1 por 1h e 18h comparado ao controle.. 39

Figura 4 - **(A)** Células da linhagem RT4 cultivadas em McCoy's 20% **(B)** Células da linhagem RT4 após tratamento com Prima-1 **(C)** Células da linhagem T24 cultivadas em McCoy's 20% **(D)** Células da linhagem T24 após tratamento com Prima-1..... 43

Figura 5 - Aspecto microscópico da T24 antes da exposição ao UVC **(A)** e 192 h após a exposição e tratamento com Prima-1 **(B)** RT4 antes da exposição ao UVC **(C)** e 192 h após a exposição e tratamento com Prima-1 **(D)** (40 x)..... 44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para quantificação da expressão dos treze genes analisados	35
--	----

Tabela 2. Valores da expressão dos genes em RT4 e T24 tratadas com Prima-1 imediatamente após, 1 h e 18 h após exposição à UVC comparadas ao controle (células não tratadas). Cálculo realizado através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$	40
--	----

Resumo

Piantino CB. Análise do efeito do Prima-1 na expressão dos genes envolvidos na morte celular programada em linhagens de câncer de bexiga [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é o segundo tumor mais frequente do trato urinário. A perda da função do *p53* é a alteração mais conhecida do carcinoma urotelial de alto grau invasivo. Prima-1 é uma pequena molécula, a qual restaura a função do *p53* mutado promovendo a morte celular em vários tipos celulares. O objetivo do nosso estudo foi analisar o efeito do Prima-1 na indução da apoptose mediada por *p53* após indução do dano ao DNA em linhagens de CUB.

Material e métodos: O mecanismo de ação do Prima-1 foi avaliado em duas linhagens celulares de câncer de bexiga, T24 que tem como característica a mutação do *p53* e RT4 que possui *p53* intacto. Características morfológicas da apoptose, alterações no potencial de membrana mitocondrial e análise da expressão de treze genes envolvidos na apoptose mediada por *p53* foram avaliados através de observação microscópica e reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR).

Resultados: Prima-1 foi capaz de reativar a função da P53 na linhagem de câncer de bexiga com *p53* mt, promovendo a apoptose através da expressão de Bax e Puma, ativação da cascata das caspases e ruptura da membrana mitocondrial, independente de Bax, na linhagem celular T24 (*p53* mt).

Conclusão: Prima-1 foi capaz de restaurar a atividade transcricional de *p53*. Estudos experimentais in vivo poderiam ser conduzidos no intuito de testar essa molécula como um novo agente terapêutico do CUB de alto grau, invasivo, que apresenta caracteristicamente mutação de *p53*.

Descritores: neoplasias urológicas; carcinoma urotelial de bexiga; *p53*; apoptose; Prima-1.

Summary

Piantino CB. Analysis of the effect of Prima-1 in the expression of genes involved in programmed cell death in bladder cancer cell lines [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introduction: Urothelial carcinoma of the bladder is the second most common tumor of the urinary tract. Loss of *p53* function is the main genetic alteration related to the development of high-grade muscle-invasive disease. Prima-1 is a small molecule that restores tumor suppressor function to mutant *p53* and induces cell death in various cancer types. Our aim is to investigate the ability of Prima-1 to induce apoptosis after DNA damage in BC cancer cell lines.

Material and Methods: The therapeutic effect of Prima-1 was studied in two BC cell lines, T24, characterized by *p53* mutation, and RT4, with no mutation in the *p53* gene. Morphological features of apoptosis, mitochondrial membrane potential changes and expression of thirteen genes involved in *p53*-induced apoptosis were assessed by microscopic observation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Results: Prima-1 is able to reactivate P53 function in *p53*-mutated bladder cancer cell line promote apoptosis through the induction of Bax and Puma expression, activating the caspase cascade and disruption of mitochondrial membrane, independent of Bak, in T24 cell line (*p53* mt).

Conclusion: Prima-1 is able to restore the transcriptional activity of *p53*. Experimental studies in vivo could be conducted in order to test this molecule as a new therapeutic agent of the urothelial carcinoma of the bladder, which characteristically presents *p53* mutation.

Descriptors: urologic neoplasms; bladder urothelial carcinoma; *p53*; apoptosis; Prima-1.

Introdução

1. Introdução

1.1 Câncer de Bexiga

O carcinoma urotelial da bexiga (CUB) é a quarta neoplasia mais comum nos EUA onde foram estimados 73.310 novos casos e 14.880 óbitos para 2012 (Siegel e cols., 2012). Diferentemente do câncer de próstata, o CUB é raramente um achado incidental em autópsias, o que sugere que virtualmente todos os casos, em algum momento de sua história natural, se manifestarão clinicamente e serão diagnosticados.

A proporção de casos de neoplasia vesical entre homens e mulheres é de 3:1. Apesar da prevalência maior no sexo masculino, a mortalidade é cerca de 40% menor neste grupo, pois a doença tem chance 32% maior de ser diagnosticada em estágios iniciais, em relação aos casos no sexo feminino (Robbins, 2004).

Etnia e idade são outras variáveis importantes na epidemiologia do CUB. Negros têm o dobro de chance de desenvolver o carcinoma em relação aos brancos, além de possuir maior chance de disseminação do câncer e menor taxa de sobrevida. Maneiras alternativas na metabolização dos carcinógenos relacionados ao desenvolvimento da doença podem ser uma das razões que expliquem essas diferenças étnicas (Montironi e cols., 2003).

Cerca de 70-80% dos novos casos de CUB são classificados como doença não invasiva ou invasiva na lâmina própria (pTa ou pT1), sendo o restante invasivo na muscular própria, alguns já com doença metastática (Metts

e cols., 2000). Tumores de baixo grau e papilíferos em geral apresentam alterações no cromossomo 9, na proteína reguladora do ciclo celular, ciclina D1, e no receptor do fator de crescimento de fibroblasto, FGFR3. Apresentam produção excessiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promotor da angiogênese. Por outro lado, alterações nas proteínas reguladoras P53 e retinoblastoma (Rb) são comumente identificadas no carcinoma *in situ* e em formas invasivas do CUB (Gontero e cols., 2001).

Alguns fatores de risco que predispõem ao CUB já se encontram bem definidos como o tabagismo, a exposição ocupacional a aminas e a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ambos utilizados nas indústrias têxtil de corantes e de borracha. O uso de medicamentos como a ciclofosfamida e a fenacetina, as infecções crônicas e a exposição à radiação ionizante têm sido relacionadas ao desenvolvimento do CUB (Madeb e Messing, 2004).

A detecção precoce é a melhor forma para se obter uma maior probabilidade de cura, evitar o desenvolvimento de metástases e prolongar o tempo de sobrevida. Desta maneira a maioria dos cânceres de bexiga identificada precocemente apresenta um bom prognóstico ao contrário daqueles detectados em uma fase mais avançada da doença na qual o tumor já adquiriu capacidade de invasão (Theodorescu, 2003).

A cistoscopia com biópsia, método invasivo, constitui o padrão ouro para o diagnóstico do CUB (Halling, 2003). A elevada taxa de recorrência de tumores superficiais juntamente com resultados equivocados obtidos da citologia urinária bem como da utilidade limitada deste método na detecção de tumores de baixo grau (Pycha e cols., 2004; Varella-Garcia e cols., 2004),

fazem da citoscopia com biópsia uma necessidade para o diagnóstico e monitoramento desses pacientes. Novos métodos de diagnóstico não invasivo capazes de detectar anormalidades cromossômicas pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e expressão de telomerase, são considerados promissores (Mercedes e cols., 2007).

Dependendo do país, o custo do CUB desde o diagnóstico até a morte do paciente varia entre U\$89.287,00 e U\$202.203,00 (Botteman et al., 2003). O aspecto econômico do CUB é bem caracterizado na literatura. Sievert e cols. (2009) sugerem que o estabelecimento de novas tecnologias para o diagnóstico e tratamento do CUB é essencial para a redução dos gastos despendidos com esta doença.

O tratamento do CaB depende de sua forma de apresentação principalmente do tipo histológico, o estágio e grau (Miyamoto e Epstein, 2010).

Neoplasias não músculo-invasivas (pTa e pT1) recorrem com frequência e progridem para doença músculo-invasiva em um número limitado de casos, sendo geralmente submetidas a tratamento mais conservador. A ressecção transuretral (RTU) é sempre a primeira forma de tratamento para essas neoplasias seguida de terapia intravesical imuno ou quimioterápica. O tratamento de eleição do CUB não invasivo é a imunoterapia baseada no bacilo de *Calmette-Guerin* (BCG), que ainda não possui um protocolo único de utilização, no que diz respeito ao tempo e frequência de aplicações (Babjuk e cols., 2009). A cistectomia radical é recomendada em pacientes nos quais houve falha do BCG. O atraso no tratamento cirúrgico radical pode levar ao comprometimento da sobrevida câncer-específica (Fritsche et al., 2010).

Em tumores músculo-invasivos, a cistectomia é a melhor forma de controle da doença propiciando as maiores taxas de sobrevida (Herr e cols., 2004), e deve ser realizada precocemente, devido à alta velocidade de progressão desses tumores.

A perda da função da P53 é a alteração mais conhecida do carcinoma urotelial de alto grau invasivo relacionando-se com o desenvolvimento e progressão da neoplasia. Sarkis e cols. detectaram que pacientes com aumento de expressão da P53, ou seja, aqueles portadores de tumores com mutação no *p53* têm alta probabilidade de progressão (Sarkis e cols., 1993). Sua mutação tem sido relacionada à resistência ao tratamento quimioterápico, menor sobrevida global e livre de doença (Mitra e cols., 2006).

1.2 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular que envolve estímulos programados e genéticos responsáveis pela perda da viabilidade celular antes que ocorra a perda de sua integridade (Hengartner, 2000). Está presente desde a fase embriogênica e sua nomenclatura é derivada do grego *apoptosis* que significa despencar, soltar-se à semelhança das folhas que caem das árvores durante o outono (Kerr e cols, 1972; Wyllie, 1974). Alterações no processo apoptótico, relacionam-se com o aparecimento de múltiplas doenças dentre elas o câncer (Reed, 2000; D'Amélio e cols, 2008). As alterações morfológicas clássicas decorrentes da apoptose são: condensação nuclear, diminuição do tamanho celular, aumento da

permeabilidade da membrana citoplasmática, perda da adesão a células vizinhas, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Van de Schepop e cols, 1996; Hall, 1999).

Diversos fatores regulam esse mecanismo que pode ser desencadeado por estímulos intra e extracelulares que em algumas ocasiões se intercomunicam (Gewies, 2003). A via extrínseca é induzida através da ativação de receptores de morte localizados na superfície celular que irão recrutar a caspase 8, e a via intrínseca é responsiva aos sinais de estresse (Reed, 2000). Os mecanismos que guiam a escolha da via a ser utilizada pela célula é uma incógnita, sugerindo-se que o nível e a persistência da lesão ao DNA influenciam na escolha do seu destino (Vousden; Lu, 2002).

Para que ocorra apoptose é preciso que as caspases estejam em sua forma ativa. As caspases estão presentes no citoplasma celular como zimógenos inativos (pró-caspases) sendo ativadas através de seus domínios ded (*death effector domain*) e card (*caspase recruitment domain*) sendo consideradas as executoras centrais deste processo (Hengartner e cols., 2000; Ferreira e cols., 2002; Gewies, 2003). Integram uma família de endonucleases intracelulares, que são proteases de cisteína, as quais foram descobertas a partir de estudos genéticos em *Caenorhabditis elegans* (Hengartner, 1999; Hengartner, 2001; Gewies, 2003).

O mecanismo de ação das drogas quimioterápicas sobre os tumores foi por muito tempo atribuído à interação dos compostos químicos com as células alvo, culminando na morte celular devido a alterações no metabolismo celular (Ferreira e cols., 2002). Porém, vários estudos demonstraram que a morte

celular causada pela ação de quimioterápicos se dá pelo mecanismo de apoptose (Hickman, 1992; Ellis e cols., 1997; Hannun, 1997; Shao e cols., 1999; Ferreira e cols., 2002; Parton e cols., 2002; Arpino e cols., 2005).

1.2.1 Apoptose induzida por *p53*

O *p53* é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína nuclear denominada P53, a qual é componente de uma das vias responsáveis pelo controle da apoptose e do ciclo celular. Quando ocorre algum dano à molécula do DNA, observa-se um acúmulo nuclear da P53, sendo a mesma responsável pelo reparo do DNA lesado. Caso essas alterações sejam muito importantes e não possam ser reparadas, *p53* promoverá a transcrição de uma série de genes pró-apoptóticos que são ativados pela propriedade de transativação de *p53* que ocorre através da ligação da P53 aos elementos de resposta (P53 RE) localizados na região promotora de seus genes alvo (EL-Deiry e cols., 1992; Tokino; Nakamura, 2000). Embora o mecanismo completo de cada evento que ocorre durante a apoptose mediada por *p53* não ser totalmente conhecido, sabe-se que ocorre principalmente pela via intrínseca (Figura 1), mediada por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 como Bax e Bak (Parton e cols., 2001), que desempenham a função de promover a apoptose mediante a regulação do potencial de membrana mitocondrial (Cory, Adams, 2002).

Sinais intrínsecos como danos ao DNA, *stress* oxidativo ou indução por quimioterápicos tem a capacidade de desencadear a expressão dos genes pró-

apoptóticos, Puma, Noxa, Bax, Bak que atuarão junto à membrana mitocondrial alterando sua permeabilidade, promovendo a liberação do citocromo-c que juntamente com a proteína citoplasmática Apaf-1 (fator de ativação da protease), ativam a pro-caspase 9, ligando-se ao seu domínio card, originando um complexo chamado de apoptossoma. A caspase 9 ativada é a responsável por deflagrar a ativação das pro-caspases 3 e 7, a cascata das caspases, que resultará na clivagem do DNA e apoptose celular (Parton e cols., 2002; Ferreira e cols., 2002; Gewis, 2003; Hengartner, 2000). Estudos recentes têm demonstrado que a caspase 2 exerce um importante papel na apoptose intrínseca mediada por *p53* promovendo a translocação de Bax para a mitocôndria, fator chave para a liberação do citocromo-c (Shen e cols., 2008).

Independentemente do tipo de estresse, a ativação de *p53* culminará na parada do ciclo celular, indução do reparo do DNA ou na apoptose.

Figura 1. Representação esquemática dos sinais envolvidos na via intrínseca mediada por *p53*.

Diversas vias podem interagir com *p53* causando sua inativação, conforme ilustrado na figura abaixo. Em células sob condições “normais”, o nível da P53

é regulado por MDM2, MDM4, COP1, PIRH2 ou JNK os quais são responsáveis pela degradação da P53 através do sistema ubiquitina-proteassomo. Após exposição das células a condições de estresse, a ativação de *p53* ocorre primeiramente, através da inibição de sua interação com MDM2 e com outros reguladores negativos, seguindo-se uma série de moduladores (quinase, acetilases) que irão ativar sua atividade transcricional (<http://p53.free.fr>).

Figura 2- Heterogeneidade das vias envolvidas na inativação de *p53* em cânceres humanos: (<http://p53.free.fr>).

Dentre as diversas vias de regulação da *P53*, *MDM2* destaca-se como uma das principais. Além de interagir com *P53* promovendo sua ubiquitinização e conseqüente degradação, a mesma também pode reprimir a atividade transcricional da *P53* quando ativada (<http://p53.free.fr>). *MDM2* é inibida transcricionalmente por *p14* (Zhang e cols., 1998) podendo ser inativada por deleção ou metilação em sua região promotora (Dulaimi e cols., 2004; Yates e cols., 2006; Chang e cols., 2003; Kawamoto e cols., 2006).

1.3 Mutação no *p53*

A P53 em condições fisiológicas é expressa em baixos níveis nas células, apresentando uma meia vida curta, de aproximadamente 20 min (Bykov e cols., 2002), sendo que mutações geralmente promovem a sua estabilização, permitindo a sua detecção por imuno-histoquímica, embora essa correlação não seja sempre verdadeira (Bykov e cols., 2002). Há evidências que a P53 selvagem ou *wild type* (wt) pode igualmente se acumular a níveis detectáveis (Abdel-Fattah et al., 1998), em parte devido a alterações na expressão de reguladores da P53, como, por exemplo, MDM2. Por outro lado, a ausência de acúmulo nuclear da P53 não descarta a possibilidade de mutação (Erill e cols., 2004; Esrig e cols., 1993; Cordon-Cardo e cols., 1994).

As mutações são em sua maioria pontuais (missense), as quais resultam na P53 alterada, resistente à degradação pela via ubiquitina, conduzindo a formação de uma proteína estável que se acumula no núcleo celular (Dowell e cols., 1994).

George e cols. (2004) conduziram um estudo com o seqüenciamento completo do *p53*, comparando os resultados com o acúmulo nuclear da P53. Mostraram que tanto o acúmulo nuclear como a presença de mutação no gene identificada por seqüenciamento exercem papel fundamental na progressão da doença e que, a determinação de ambos os status fornecem informações sinérgicas adicionais a respeito do prognóstico de tumores. Demonstraram ainda, que não só a detecção da presença de mutação no gene, bem como a

localização desta pode ser importante para a compreensão do comportamento do tumor (George e cols., 2004).

Alguns autores têm sugerido uma associação entre um pior prognóstico de neoplasias quando da imunoexpressão da P53 detectada por imunohistoquímica mesmo na ausência de mutações. Além disso, a expressão da P53 na presença de *p53* selvagem poderia ser causada em parte por alterações na via p14/ MDM2 (Mitra e cols., 2006).

1.4 *p53* como alvo farmacológico

Evidências que *p53* seria um alvo farmacológico promissor surgiram quando foi descrito que peptídeos derivados da região c-terminal da P53 eram capazes de restaurar a função da P53 mutante com conseqüente indução de apoptose (Selivanova e cols., 1999). Pequenas moléculas, como MIRA-1 (*mutant p53 reactivation and induction of rapid apoptosis*), foram descritas por atuarem sobre o domínio conformacional da P53, mas a eficiência e as doses exigidas não são ainda apropriadas para o uso clínico (Foster e cols., 1999). Estudos têm demonstrado que a conformação do domínio de ligação do DNA da P53 é flexível e que mudanças conformacionais da P53 mutante são reversíveis (Wang e cols., 2003).

Prima-1 (*reactivation and initiation of massive apoptosis*) é um composto químico descrito por suprimir o crescimento celular em linhagens que exibem mutação no *p53*. Entretanto os mecanismos de ação deste composto não foram ainda elucidados (Bykov e cols., 2002).

1.5 Prima-1

Prima-1 é capaz de suprimir o crescimento celular em linhagens que exibem mutação no *p53*, através do restauro da sua atividade transcricional. Este composto foi descoberto em bibliotecas químicas de moléculas capazes de induzir a morte celular em linhagens de células que apresentavam mutação no *p53*. Essa pequena molécula de peso molecular de 185 kd restaura seqüências específicas de ligação do *p53* com o DNA recuperando a conformação funcional da P53 gerada pelo gene mutado, restaurando sua atividade transcricional (Bykov e cols., 2002).

Estudos demonstram que Prima-1 promove a inibição do crescimento de células tumorais que expressam *p53* mutado, o que não é observado em células deficientes em *p53* ou naquelas que possuem a forma selvagem (Wang e cols., 2007).

Os mecanismos responsáveis por esta atividade preferencial sobre as células *p53* mutadas e as vias envolvidas na morte celular são desconhecidos. Aparentemente Prima-1 restaura a área de ligação entre P53 e os genes por ela regulados que foi alterada pela mutação, permitindo a natural ativação da transcrição de genes como, WAF1, Bclx e Puma que atuam na inibição do ciclo celular e na indução da apoptose (Wang , 2007; Shi e cols., 2008).

É preciso ressaltar que não há trabalhos na literatura que elucidam a ação do Prima-1 em linhagens de CUB, o que poderia ser um campo promissor para pesquisas relacionadas à compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de apoptose mediado por Prima- 1 no CUB, uma vez que perda da

função da P53 é a alteração mais conhecida nesta neoplasia, que poderia no futuro ser utilizado como agente terapêutico.

Objetivos

2. Objetivo

2.1 Objetivo primário

Analisar o efeito do Prima-1 na promoção da apoptose após indução do dano ao DNA em linhagens de CUB.

2.2 Objetivo secundário

Analisar a via de *p53* na indução da apoptose após tratamento de linhagens de CUB com Prima-1 através do perfil de expressão de genes a ela relacionada.

.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do HCMUSP, tendo sido aprovado na reunião de 05/08/2009 (protocolo nº 0718/09).

3.1 Linhagens Celulares e Tratamento

Utilizamos a linhagem comercial T24 (*p53* mt), estabelecida a partir de espécime cirúrgico de paciente com CUB de alto grau invasivo, comumente utilizada como modelo em estudos de sensibilidade a drogas. Para controle dos nossos experimentos, foi utilizada a linhagem RT4 (*p53* wt), derivada de explante de um tumor papilar de bexiga. A linhagem T24 foi adquirida junto ao *American Tissue Cell Culture* (ATCC) gentilmente cedida pela Dra. Daisy Salvadori (Unesp, Botucatu) e a RT4 no *European Collection of Cell Cultures* (ECACC).

As linhagens foram acondicionadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio McCoy's, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 20% e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) a 1%. Os frascos foram mantidos em estufa para cultura de células contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. O meio de cultivo foi trocado quando atingido o estado de subconfluência em monocamada, 70% da área cultivável recoberta por células (Davis, 2004).

Para realização dos experimentos, células das linhagens T24 e RT4 foram semeadas em frascos de cultura e mantidas em estufa de células por 24

h. Após este período, as células foram expostas a radiação UVC (253,7 nm) por duas h para indução de dano ao DNA. A radiação UVC causa lesões no DNA, além de ser uma metodologia relativamente fácil de ser implantada no laboratório, uma vez que a maioria das lâmpadas germicidas emite luz UVC (Batista e cols., 2009; Schuch e cols., 2010). Após exposição, as células foram tratadas com Prima -1 a 50 μ M (Sigma, St.Louis, MO, USA) por um período variável de uma a 192 h.

3.2 Análise do perfil de expressão dos genes Puma, Noxa, Bak, Bax, Citocromo-c, Apaf-1, Casp2, Casp3, Casp7, Casp9 , p21, MDM2 e p53

3.2.1 Extração do RNA total

Para a realização dos experimentos, prosseguimos conforme descrito anteriormente. Como controle do ensaio, não foi adicionada qualquer substância ao frasco de cultura utilizado como controle, sendo as células mantidas com 4 mL de McCoy's acrescido de SFB a 20%. O RNA total foi extraído com o uso do Kit mirVanaTM (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em nanodrop (260/280 nM) (Thermo Scientific).

3.2.2 Transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 200 ng de RNA utilizando-se a enzima MultiScribe™ transcriptase reversa e iniciadores randômicos (Applied Biosystems). Resumidamente, o RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume foram acrescentados 4,0 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (100 mM), 4,0 µL do tampão da enzima (10X), 4,0 µL de RTBuffer (10X) e 8,4 µL de água RNA/DNA nuclease free. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C. Após o término dos ciclos, o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.2.3 Análise da expressão por qRT-PCR

Os primers que foram utilizados para amplificação dos genes (Tabela 1) foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems, California, USA), o qual desenha primers com as características necessárias para os experimentos de qRT-PCR no termociclador ABI 7500 Fast. As principais características desses oligos são: amplificar fragmentos cujo tamanho máximo não exceda 20 pb, quantidade moderada de CG (40-60%), não possuir capacidade de anelar entre si, ou formarem estrutura secundária e temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Levando em conta os parâmetros citados, os primers foram desenhados para cada um dos genes analisados.

Para quantificação dos genes foi utilizado o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, California, USA). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a detecção do produto da qRT-PCR.

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,5 µL do primer específico, 5 µL de TaqMan® Universal PCR máster mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 3,5 µL de água livre de nuclease RNA e 1 µL de cDNA. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C. A TaqMan B2M foi utilizada como controle endógeno (Tabela 1).

O nível de expressão dos treze genes analisados foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT} = (CT \text{ gene alvo, T24 e RT4 após 1 h, 18 h e 192 h de exposição ao Prima-1 50 } \mu\text{M} - CT \text{ controle endógeno, nas mesmas condições}) - (CT \text{ gene alvo, T24 e RT4 sem Prima-1} - CT \text{ controle endógeno, nas mesmas condições})$.

Tabela 1. Primers utilizados para quantificação da expressão dos treze genes analisados.

Gene	Identificação do ensaio
Casp2	Hs00234982_m1
Casp3	Hs00234385_m1
Casp7	Hs00169152_m1
Casp9	Hs00964603_m1
BBC3 (Puma)	Hs00248075_m1
Bak	Hs00940249_m1
Bax	Hs00180269_m1
MDM2	Hs01066930_m1
PMAIP1 (Noxa)	Hs00382168_m1
CDKN1A (p21)	Hs00355782_m1
<i>p53</i>	Hs01034249_m1
Apaf-q1	Hs00559441_m1
CYC1(citocromo-c)	Hs00357717_m1
B2M	Hs99999907_m1

3.3 Análise do potencial da membrana mitocondrial

Para esse procedimento foi utilizado o kit DePsipher™ (Trevigen, Helgerman Ct. Gaithersburg). Células das linhagens T24 e RT4 foram cultivadas sobre lamínula de vidro em placa de 6 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço em um volume final de 4 mL. Após 24 h de incubação em estufa a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, as células foram

expostas a radiação UVC (253,7 nm) por 2 h. Posteriormente retiramos o meio de cultura da placa e acrescentamos a solução de Prima-1 a 50 μ M (volume final de 4mL/poço). Como controle do ensaio, não foi adicionada qualquer substância à fileira da placa utilizada como controle, sendo as células mantidas com 4 mL de McCoy's acrescido de SFB a 20%. Após 18 h de incubação, o meio de cultura foi removido e as células cobertas com DePsipher (5 μ g/mL) seguindo-se nova incubação por 20 min em estufa para cultura de células. As células foram lavadas com 1 mL do buffer de reação fornecido pelo kit. A lamínula de vidro foi fixada em lâmina para microscopia e analisada imediatamente ao microscópio disposto com filtro longo (fluoresceína e rodamina). Nas células saudáveis, as mitocôndrias dispunham de pontos vermelhos (590 nm) e naquelas com a membrana mitocondrial comprometida foi visualizado, no citoplasma, a coloração verde (530 nm).

3.4 Avaliação da apoptose

Células das linhagens T24 e RT4 foram semeadas em frascos de cultura e mantidas em estufa de células por 24 h. Após este período, as células foram expostas a radiação UVC (253,7 nm) por duas h. Posteriormente as células foram tratadas com Prima-1 a 50 μ M (Sigma, St.Louis, MO, USA) por um período variável de uma a 192 h. Os aspectos morfológicos das células foram analisados e fotografados ao microscópio óptico.

Resultados

4. Resultados

4.1 Perfil de expressão gênica

O perfil de expressão dos genes analisados em ambas as linhagens após exposição à radiação UVC e tratamento com Prima-1 está representado na Figura 3 e os valores da expressão na Tabela 2.

Figura 3 - Perfil de expressão dos genes Puma, Noxa, Bak, Bax, Citocromo-c, Apaf-1, Casp9, Casp7, Casp3, Casp2, p21, MDM2 e p53, nas linhagens RT4 (*p53* wt) e T24 (*p53* mt) após exposição a radiação UVC e tratamento com Prima -1 por 1 h e 18 h comparado ao controle.

Tabela 2- Valores da expressão dos genes em RT4 e T24 tratadas com Prima-1 imediatamente após, 1 h e 18 h após exposição à UVC comparadas ao controle (células não tratadas). Cálculo realizado através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Genes	RT4/uv	T24/uv	RT4/1h	T24/1h	RT4/18h	T24/18h
Puma	0,04	0,95	0,39	0,52	0,38	11,90
Noxa	-	2,88	1,18	2,87	2,00	0,01
Bak	13,99	-	1,30	-	1,33	-
Bax	0,99	-	0,25	-	0,14	3,01
Apaf-1	1,10	2,18	1,48	1,17	2,45	9,11
Casp9	3,73	5,50	12,45	4,65	14,81	0,30
Casp7	1,66	3,65	0,13	3,66	1,13	15,30
Casp3	1,43	1,83	1,10	1,46	1,99	3,19
Casp2	1,60	1,81	2,41	1,61	6,79	8,73
Citocromo-c	3,89	12,00	4,28	7,08	2,74	44,94
p21	5,74	9,85	2,40	12,67	1,98	22,31
MDM2	2,88	5,76	7,80	6,51	5,07	26,37
p53	63,86	3,11	21,05	2,63	10,28	32,92

4.1.2 Prima-1 e apoptose

Pmaip 1 e Bbc3, importantes genes induzidos por *p53* e essenciais para a indução da apoptose, transcrevem Noxa e Puma, respectivamente. Na linhagem T24 a expressão de Noxa foi demonstrada após exposição à radiação UVC e uma hora após tratamento com Prima-1 e, em RT4, após tratamento. Puma não foi detectado em RT4, mas foi superexpresso em T24 no tempo de 18 h.

A oligomerização de Bak e Bax altera a permeabilidade da membrana mitocondrial com consequente liberação do citocromo-c e ativação das caspases. Nossos resultados demonstraram que a expressão de Bax na linhagem T24 ocorreu apenas 18 h após tratamento com Prima-1, enquanto que Bak não foi expresso em qualquer momento. Diferentemente, Bak foi expresso por RT4 e a expressão de Bax não foi observada.

A análise da caspase 9 e Apaf-1, envolvidos na ativação da cascata das caspases, demonstrou progressiva superexpressão em RT4. O aumento da expressão do citocromo-c foi observado até uma hora após o tratamento. Na linhagem T24, estes genes foram expressos logo após exposição ao UVC, mantiveram a expressão após 1 h, e foram ainda mais expressos após 18 h de tratamento com Prima-1, com exceção da caspase 9. A caspase 2 tem sido considerada uma caspase órfã e descrita como uma caspase iniciadora. Observamos progressiva superexpressão da caspase 2 em T24 e RT4. A análise das caspases efetoras 3 e 7 demonstrou maior expressão após 18 h do tratamento com Prima-1 na linhagem T24. Células da linhagem RT4

apresentaram maior expressão da caspase 3 após 18 h e da caspase 7 logo após exposição ao UVC.

4.1.3 Prima-1 e a ativação do *p53*

A fim de demonstrarmos a relação entre a indução da apoptose e o restabelecimento da ativação transcricional de *p53*, avaliamos a expressão de MDM2 e p21; importantes genes regulados por *p53*. Nossos dados demonstraram que em RT4 houve um progressivo aumento de expressão de MDM2 com pico em 1 h enquanto que em T24 o aumento de expressão foi progressivamente maior com pico em 18 h. Quanto a p21, RT4 mostra uma expressão maior imediatamente após a exposição a UVC enquanto em T24 também existe um aumento progressivo com maior expressão em 18 h. Esse achado é interessante e demonstra que *p53* é imediatamente ativado após a lesão celular enquanto T24 quando tratado com Prima-1 necessita de um tempo maior para transcrição dos genes com elemento de resposta a *p53*.

Da mesma maneira a expressão de *p53* em RT4 (*p53* wt) se deu logo após a indução do dano mediado por UVC, enquanto que nível de expressão semelhante foi observado em T24 (*p53* mt) somente após 18 h do tratamento com Prima-1.

4.2 Análise do potencial da membrana mitocondrial

Análise do potencial de membrana mitocondrial revelou após 2 h de exposição à radiação UVC (253,7 nm) seguida por 18 h de tratamento com

Prima-1 a 50 μ M, ruptura da membrana mitocondrial (células marcadas em verde) nas células da linhagem RT4 e T24. Células da linhagem RT4 mantidas como controle (sem tratamento com Prima-1) também apresentaram ruptura da membrana mitocondrial o que não foi observado nas células da linhagem T24(células marcadas em vermelho) (Figura 4).

Figura 4- (A) Células da linhagem RT4 cultivadas em McCoy's 20%. (B) Células da linhagem RT4 após tratamento com Prima-1 (C) Células da linhagem T24 cultivadas em McCoy's 20% (D) Células da linhagem T24 após tratamento com Prima-1.

4.3 Análises morfológicas

Após 2 h de exposição à radiação UVC (253,7 nm) seguida por 192 h de tratamento com Prima-1 a 50 μ M, foram observadas alterações morfológicas relacionadas à apoptose em ambas as linhagens, como perda da adesão celular e inclusões citoplasmática confirmando o papel do Prima-1 no restauro da atividade de *p53* mt e promoção da apoptose (Figura 5).

Figura 5 – Aspecto microscópico da T24 antes da exposição ao UVC (**A**) e 192 h após a exposição e tratamento com Prima-1 (**B**) RT4 antes da exposição ao UVC (**C**) e 192 h após a exposição e tratamento com Prima-1 (**D**) (40 x).

Discussão

5. Discussão

Neste estudo, demonstramos que Prima-1 foi capaz de promover o restauro da atividade transcricional do *p53* na linhagem de câncer de bexiga T24 (*p53* mt).

Nossos achados demonstraram, na linhagem T24, que a expressão de Noxa se deu logo após exposição à radiação UVC e 1h após tratamento com Prima-1 e, em RT4, após tratamento com o referido composto. Não foi observada expressão de Puma na linhagem RT4, mas o mesmo foi superexpresso em T24 após 18 h de tratamento. A oligomerização de Bak e Bax altera a permeabilidade da membrana mitocondrial com consequente liberação do citocromo-c e ativação das caspases. Nossos resultados demonstraram que a expressão de Bax na linhagem T24 ocorreu apenas 18 h após tratamento com Prima-1, enquanto que Bak não foi expresso em qualquer momento. Diferentemente, Bak foi expresso por RT4 e a expressão de Bax não foi observada.

Bieging e Attardi demonstraram a participação de *p53* na via intrínseca da apoptose mediante a indução de Bax, Puma e Noxa (Bieging, Attardi, 2012). Desta maneira, podemos afirmar que em nosso modelo, a exposição das células da linhagem T24 a radiação UVC seguido do tratamento com Prima-1, foi capaz de promover a apoptose pela via intrínseca através do restauro da função transcricional de *p53* com consequente indução da expressão de Bax, Puma e Noxa.

Noxa e Puma são respectivamente transcritos por Pmaip1 e Bbc3, importantes genes induzidos por *p53* e essenciais para a indução da apoptose mediada por este gene (Nakano, Vousden, 2001; Jeffers e cols., 2003).

Outros autores em estudos com camundongos *knockout*, demonstraram que Puma desempenha importante papel na apoptose mediada por *p53* em uma ampla gama de tipos de celulares (Villunger et al., 2003; Jeffers et al., 2003; Erlacher et al., 2005) enquanto que a atuação de Noxa neste modelo de apoptose tem sido restrita aos fibroblastos (Shibue et al., 2003).

O efeito dramático que a perda de Puma exerce na sensibilidade de diferentes tipos celulares em relação à morte celular induzida por *p53*, é particularmente revelador (Villunger e cols., 2003; Vousden, 2005) indicando que Puma é um mediador crucial da apoptose em resposta a *p53*.

Lomonosova e cols. (2009) demonstraram que proteínas BH3, como Puma, juntamente com *p53*, poderiam superar a dependência de Bax e Bak em mediar à morte celular. Estes resultados ajudam a explicar nossos achados uma vez que observamos a expressão de Puma e ausência de Bak, e a expressão de Bax independente de Bak foi suficiente para indução da apoptose. Por outro lado, observamos na linhagem RT4, a ocorrência de apoptose independente da expressão de Puma. Diferentemente do mecanismo de apoptose descrito, foi demonstrado que a cisplatina em células da linhagem RT4 foi capaz de promover a fosforilação e estabilização do *p53* com consequente ativação de Fas, Puma e Caspase 10 (Konstantakou e cols., 2009).

Um evento crítico para a formação do apoptossomo é a liberação do citocromo c pela mitocôndria, etapa regulada por membros da família Bcl-2 (Youle e Strasser, 2008). A proteína Bcl-2 é apenas uma representante desta família de proteínas, cujos membros possuem pelo menos um dos quatro domínios conservados, conhecidos como Domínios de Homologia à Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4). Funcionalmente, os membros desta família dividem-se em dois grupos. O grupo anti-apoptótico e o grupo pró-apoptótico. Sendo o primeiro composto por quatro domínios, BH4, dos quais Bcl-2 é o mais conhecido e o segundo grupo formado apenas pelo domínio BH3 (*only*) composto, dentre outras, por Bax e Bak. Uma vez que a família BH3-*only* é ativada, a mesma é capaz de superar o efeito inibitório dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, permitindo a oligomerização de Bax e Bak junto à membrana mitocondrial externa. Nossos resultados apresentaram divergência quanto à participação de Bak e Bax. Observamos a atuação de Bak junto à linhagem RT4 e Bax nas células da linhagem T24. Vias alternativas apresentadas por outros autores são úteis para compreensão destes resultados discrepantes.

Lei e cols. (2006) demonstraram que o gossipol (composto polifenólico natural encontrado em sementes de algodão e utilizado em testes de infertilidade) é capaz de induzir a ruptura da membrana mitocondrial promovendo a liberação de citocromo c independente da ativação de Bax e Bak. Green (2005) postulou a existência de duas vias alternativas para a liberação do citocromo-c. A primeira seria a ativação e oligomerização de Bax e consequente interação com outras proteínas da membrana mitocondrial ou abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial externa e

liberação inespecífica do citocromo-c. Claveria e cols. (2004), em experimento no qual se utilizou camundongos *bak*^{-/-} / *bax*^{-/-} constataram a ocorrência de morte celular programada sem a participação das proteínas.

Estudo publicado por Bieging e Attardi e cols. sobre a elucidação das vias transcricionais de *p53* na supressão dos tumores, demonstrou que a falta de Bax e Puma não é suficiente para reduzir a apoptose em certos tipos celulares, o que poderia explicar a ocorrência de apoptose na linhagem celular RT4 mesmo sem a participação dessas proteínas (Bieging e Attardi, 2012).

A caspase-9 é uma caspase iniciadora e, portanto, envolvida na iniciação da cascata proteolítica, a qual está associada com a via intrínseca da apoptose (Li et al., 1997; Budihardjo et al., 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7, enzimas chaves para a proteólise e consequente morte celular (Taylor et al., 2008). Análise da caspase 9, Apaf-1 e citocromo-c, iniciadores da apoptose, demonstrou superexpressão desses genes em ambas linhagens após tratamento com Prima-1.

Nossos achados, revelam ainda, que o nível máximo de expressão da caspase 9 na linhagem T24 ocorreu logo após exposição a radiação UVC, seguida por uma redução gradual dos níveis de expressão, enquanto que em RT4 a máxima expressão se deu tardiamente. As caspases efetoras, 3 e 7, apresentaram níveis máximos de expressão após 18 h na linhagem T24. A linhagem RT4 apresentou padrão de expressão semelhante em relação à caspase 3. Em relação à caspase 7, a máxima expressão foi observada logo após a exposição a radiação UVC.

A caspase 2 é considerada uma caspase órfã e tem sido classificada junto as caspases iniciadoras. Além disso, dentre todas as caspases, é a mais conservada evolutivamente (Lamkanfi e cols., 2002) e, embora haja diversos artigos que discorram sobre o papel da caspase-2 na apoptose, há várias controvérsias acerca dessa proteína, dificultando seu enquadramento junto a cascata apoptótica. Embora a caspase-2 apresente especificidade para alguns substratos das caspases executoras (Talanian e cols., 1997; Thornberry e cols., 1997), devido a diversos aspectos, considera-se a mesma como uma caspase iniciadora. Caspase 2 cliva membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Guo e cols, 2002) e esse mecanismo tem sido considerado a maneira pela a qual inicia a apoptose. Observamos progressiva expressão da caspase 2 em ambas linhagens analisadas confirmando os dados publicados por Shen e cols. (2008), que demonstraram que esta caspase desempenha importante papel na via intrínseca da apoptose mediada por *p53* promovendo a translocação de Bax para a mitocôndria, passo-chave para a liberação do citocromo c (Shen e cols., 2008).

A perda do potencial de membrana mitocondrial na linhagem T24 foi observada após 18 h do tratamento com Prima-1, demonstrando que este mecanismo é alvo direto da ação deste composto, corroborando com os achados de Shen e cols (Shen e cols., 2008).

O aspecto morfológico observado nas linhagens T24 e RT4 após 192 h de tratamento com Prima-1 demonstra claramente a ocorrência de alterações morfológicas.

A fim de demonstrarmos a relação entre a indução da apoptose e o restabelecimento da ativação transcricional de *p53*, avaliamos a expressão de MDM2 e p21; importantes genes regulados por *p53*. Nossos dados demonstraram que em RT4 houve um progressivo aumento de expressão de MDM2 com pico em 1 h enquanto que em T24 o aumento de expressão foi progressivamente maior com pico em 18 h. Quanto ao p21, RT4 mostra uma expressão maior imediatamente após a exposição à UVC enquanto em T24 também existe um aumento progressivo com maior expressão em 18 h. Esse achado é interessante e demonstra que *p53* é imediatamente ativado após a lesão celular na linhagem RT4 enquanto que, T24 quando tratada com Prima-1 necessita de um tempo maior para transcrição dos genes com elemento de resposta a *p53*.

O aumento gradual de p21 após exposição à radiação UVC e subsequente tratamento com Prima-1, configura-se evidencia adicional do restauro e ativação do *p53* com consequente indução da expressão de diversos genes, incluindo o próprio p21 (Xiong e cols, 1993). Messina e cols., em estudo sobre o efeito do Prima-1 em células de câncer de tireoide também demonstraram o aumento da expressão de p21 após tratamento com este composto (Messina et al., 2011).

Analisando a expressão do *p53* nas linhagens estudadas expostas a radiação UVC e subsequente tratamento com Prima-1, podemos observar a imediata superexpressão do *p53* na linhagem RT4 (*p53* wt) logo após exposição ao UVC. Entretanto, nível de expressão semelhante foi detectado 18 h após tratamento com Prima-1 na linhagem T24 (*p53* mt). Além disso, o nível de expressão de *p53* nas células da linhagem T24 após o dano celular foi

significativamente menor do encontrado em RT4. Nossos resultados também revelaram que Prima-1 foi capaz de atuar e aumentar os níveis do mRNA do *p53* na linhagem com a forma mutada deste gene. O mecanismo envolvido neste fenômeno ainda não havia sido relatado necessitando de estudos adicionais.

Não há dados na literatura que elucidam a ação do Prima-1 em linhagens de câncer de bexiga. A presença de mutação no *p53* no carcinoma urotelial de alto grau invasivo é a alteração mais conhecida bem como a falta de boas opções terapêuticas nestes casos (Cory e Adams, 2002). A possibilidade do restauro da atividade do *p53* seria de grande interesse e a possibilidade de usá-lo de forma intravesical é tentadora.

Em conclusão, demonstramos que Prima-1 foi capaz de reativar a função do *p53* na linhagem T24 (*p53* mt) promovendo a ativação da via intrínseca da apoptose através da indução da expressão de Bax e Puma, ativação da cascata das caspases, e ruptura da membrana mitocondrial, independente de Bak.

Perspectivas Futuras

6. Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras, podemos propor ensaios experimentais *in vivo* utilizando o Prima-1 como uma nova terapia para o câncer de bexiga de alto grau.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

Abdel-Fattah R, Challen C, Griffiths TR, Robinson MC, Neal DE, Lunec J.: Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 12: 2230-8, 1998

Arpino G, Ciocca DR, Weiss H, Allred DC, Daguerre P, Vargas-Roig L, et al. Predictive value of apoptosis, proliferation, HER-2, and topoisomerase II alpha for anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 92:69-75; 2005

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R et al EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 54:303–314, 2009

Bieging KT, Attardi LD. (2012) Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in Cell Biology* 22:97-106.

Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 21:1315–1330, 2003

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X & Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269–290, 1999

Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., et al.: Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Med* 8: 282-288, 2002

Bykov, V.J.N., N. Zache, H. Stridh, et al., PRIMA-1MET synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis, *Oncogene* 24:3484–3491, 2005

Chang LL, Yeh WT, Yang SY, et al: Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol* 170:595-600, 2003

Claveria, C., Martinez, A., Torres, M. A Bax/Bak-independent mitochondrial death pathway triggered by Drosophila Grim GH3 domain in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 279, 1368-1375, 2004

Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, et al: p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 56:347-353, 1994

Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev. Cancer* 2: 647–656 ,2002

Davis JM. Basic cell culture. A practical approach. , 2nd ed. Oxford: Oxford University Press , 2004

Dowell SP, Wilson POG, Derias NW, et al: Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 54:2914-2918, 1994

Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, et al.: Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 10:1887-1893, 2004

El-Deiry W.S., S. Kern, J.A. Pietenpol, K.W. Kinzler and B. Vogelstein: Definition of a consensus binding site for p53, *Nat Genet* 1:45–49, 1992

Ellis PA, Smith IE, McCarthy K, Detre S, Salter J, Dowsett M. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet*. 1997; 349: 849.

Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for γ -radiation and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106: 4131–4138, 2005

Esrig D, Spruck CH III, Nichols PW, et al: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 143:1389-1397, 1993

Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 8: 2024-34, 2002

Foster BA, Coffey HA, Morin MJ and Rastinejad F .Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286: 2507–2510, 1999

Fritsche HM, Burger M, Dietmaier W, et al. Multicolor FISH (UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *Am J Clin Pathol*. 2010 Oct;134(4):597-603.

Gewies A. Introduction of apoptosis. *ApoReview*. [serial online] 2003:1-26. Available from: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm> [2009 June 17]

Gontero P, Tizzani A, Muir GH, caldera E, Pavone Macaluso M.: The genetic alterations in the oncogenic pathway of transitional cell carcinoma of the bladder and its prognostic value. *Urol Res* 29:377-87, 2001

Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**: 671–674, 2005.

Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277:13430-13437.

Halling KC: Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 3:507-19, 2003

Hengartner MO. Programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Recent Prog Horm Res.* 54:213-22, 1999

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-6, 2000

Hengartner MO. Apoptosis: DNA destroyers. *Nature* 412:27-9, 2001

Herr HW, Smith JA, Montie JE. Standardization of radical cystectomy: time to count and be counted. *BJU Int.* 2004 Sep;94(4):481-2

Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocr Relat Cancer.* 6:3-8; 1999

Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood.* 89:1845-53.

Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL and Zambetti GP: Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4: 321–328, 2003

Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, et al: p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 339:790-796, 2006

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-57, 1972

Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ. (2009) Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *Int J Oncol* 35:401-416.

Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9:358-361.

Lei X, Chen Y, Du G, Yu W, Wang X, Qu H, Xia B, He H, Mao J, Zong W, Liao X, Mehrpour M, Hao X, Chen Q. Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *FASEB J*. 20(12):2147-9, 2006

Lomonosova E, Ryerse J, Chinnadurai G. BAX/BAK-independent mitoptosis during cell death induced by proteasome inhibition? *Mol Cancer Res*. 7(8):1268-84, 2009

Madeb R., Messing E.M. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol*. 22:86-92, 2004

Mercedes Marián-Aguileraa, Lourdes Menguala, Mari'a Jose' Ribala, Moise's Burseta, Yolanda Arceb, Elisabet Arsb, Artur Oliverb, Humberto Villavicenciob, Ferran Algabab, Antonio Alcaraz. Utility of a multiprobe fluorescence in situ

hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 173:131-135, 2007

Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, Gianì F, Vigneri R, Frasca F. Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer*. 2011

Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR, Jr. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*. 92: 285–294, 2000

Miyamoto H, Epstein JI. Transurethral resection specimens of the bladder: outcome of invasive urothelial cancer involving muscle bundles indeterminate between muscularis mucosae and muscularis propria. *Urology*. 2010 Sep;76(3):600-2.

Mitra AP et al.: Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J. Clin. Oncol*. 24:5552-64, 2006

Montironi R, Lopez-Beltran A, Mazzucchelli R, Bostwick DG. Classification and grading of the non-invasive urothelial neoplasms: recent advances and controversies. *J Clin Pathol*. 56:91-5, 2003

Nakano K, Vousden KH. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.

Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*. 322: 1528- 32, 2001

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 8:2100-8, 2002

Pycha A, Lodde M, Comploj E, Negri G, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Lusuardi L, Palermo S, Mian C. Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? *Urology* 63:472-5, 2004

Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol.* 157:1415-30, 2000

Robbins RS (editor). *Pathologic Basis of Disease.* 7 ed. WB Saunders, Filadélfia EUA, 2004

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhan Z, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst,* 85: 53-59, 1993.

Selivanova G, Ryabchenko L, Jansson E, Iotsova V and Wiman KG Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3395–3402, 1999

Shao ZM, Li J, Wu J, Han QX, Shen ZZ, Fontana JA, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer induces apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 53:263-9; 1999

Shen J, H Vakifahmetoglu, H Stridh, B Zhivotovsky and KG Wiman. PRIMA-1MET induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene* 27: 6571–6580, 2008

Shi H, Lambert JM, Hautefeuille A, Bykov VJ, Wiman KG, Hainaut P, de Fromental CC.: In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis* 29:1428-1434, 2008

Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T and Tanaka N: Integral role of Noxa in p53- mediated apoptotic response. *Genes Dev.* 17: 2233–2238, 2003

Sievert KD, Amend B, Nagele U et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*, 2009

Siegel R, Naishadham R, Jemal A. Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 62:10–29, 2012

Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, et al. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272:9677-9682.

Taylor RC, Cullen SP & Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231–241, 2008

Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urotelial bladder cancer. *Histpatol* 18:259-274, 2003

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, et al. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272:17907-17911.

Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 33:1-6, 2000

Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 22:16-9, 2004

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mollauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM and Strasser A : p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302: 1036–1038, 2003

Vousden, K. H. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* **309**:1685–1686 ,2005

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. Dec 16; 366(6456):701-4, 1993

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARFINK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725-734, 1998

Yates DR, Rehman I, Meuth M, et al: Methylation analysis: A prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 25:1984-1988, 2006

Youle RJ, Strasser A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.

Wang W, Rastinejad F, El-Deiry WS. Restoring p53-dependent tumor suppression. *Cancer Biol Ther*. 4 :55-63, 2003

Wang T, et al.: PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 352:203–212, 2007

Wyllie AH. Death in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 7:35-42; 1974

Apêndice

Apoptosis

The role of Prima-1 in apoptosis induced by UVC in bladder cancer cell lines

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	APPT-D-12-00039
Full Title:	The role of Prima-1 in apoptosis induced by UVC in bladder cancer cell lines
Article Type:	Manuscript
Keywords:	bladder cancer; p53; apoptosis; Prima-1.
Corresponding Author:	Camila Piantino University of Sao Paulo Sao Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Camila Piantino
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Camila Piantino
	Sabrina Reis
	Nayara Viana
	Iran Silva
	Denis Moraes
	Alberto Antunes
	Nelson Dip
	Miguel Srougi
Order of Authors Secondary Information:	Katia Leite

Apoptosis in bladder cancer cell lines induced by Prima-1

Camila B. Piantino, Sabrina T. Reis, Nayara Isabel Viana, Iran Amorim da Silva, Alberto Azoubel Antunes, Miguel Srougi, Katia R. M. Leite.

Laboratory of Medical Investigation (LIM55), Urology Department, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Bladder cancer (BC) is the second most common tumor of the urinary tract with high rates of recurrence and progression. The loss of function of p53 is the most important genetic abnormality of high-grade invasive urothelial carcinoma related to development and progression of the neoplasia. The aim of our study is to analyze the role of Prima-1 in BC cell line T24 and RT4 that has as characteristic mutated and intact p53 gene respectively, analyzing whether this compound is able to induce p53 activity.

The role of Prima-1 in apoptosis induced by UVC in bladder cancer cell lines

Camila B. Piantino, Sabrina T. Reis, Nayara I. Viana, Iran A. Silva, Denis R. Morais,
Alberto A. Antunes, Nelson Dip, Miguel Srougi and Katia R. Leite

Affiliation and address of the authors:

Laboratory of Medical Investigation, Urology Department – LIM55, Medical School,
São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil
Av. Dr. Arnaldo, 455
01246-903 São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author

Camila Belfort Piantino

E-mail: camilapiantino@hotmail.com

Telephone number: +55 11 3061-7183

Fax number: +55 11 3061-8469

Abstract

Purpose: Bladder cancer (BC) represents 3% of carcinomas in the Brazilian population, having the second highest in incidence among urological tumors after prostate cancer. Loss of p53 function is the main genetic alteration related to the development of high-grade muscle-invasive disease. Prima-1 is a small molecule that restores tumor suppressor function to mutant p53 and induces cell death in various cancer types. Our aim is to investigate the ability of Prima-1 to induce apoptosis after DNA damage in BC cancer cell lines.

Experimental Design: The therapeutic effect of Prima-1 was studied in two BC cell lines, T24, characterized by p53 mutation, and RT4, with no mutation in the p53 gene. Morphological features of apoptosis as well as DNA fragmentation, mitochondrial membrane potential changes and expression of thirteen genes involved in p53-induced apoptosis were assessed by DNA ladder analysis, microscopic observation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

Results and Conclusion: In conclusion, we have shown that in the T24 p53-mutated bladder cancer cell line, Prima-1 is able to reactivate p53 function, promote apoptosis through the induction of Bax and Puma expression, activate the caspase cascade, and promote DNA degradation and disruption of mitochondrial membrane independent of Bak. We propose in vivo experimental trials using Prima-1 as a new therapy for high grade bladder cancer. **Keywords:** bladder cancer, p53, apoptosis, Prima-1.

Introduction

Bladder cancer (BC) represents 3% of carcinomas in the Brazilian population and represents the second highest incidence of urological tumors after prostate cancer (1), with 73.310 new cases and 14.880 deaths estimated in the USA in 2012 (2).

Tobacco smoking, occupational exposure to aromatic amines, arsenic, radiation therapy of neighboring organs and therapeutic use of alkylating agents are the main risk factors for the development of urothelial tumors (3).

A large number of genetic changes have been associated with the genesis and progression of BC, many of which appear to abrogate the G1/S cell cycle checkpoint (4). In particular, loss of p53 function has been related to the development of high-grade muscle-invasive disease (5).

As a key gatekeeper of the G1/S checkpoint of cell-cycle progression, p53 is indispensable for maintaining genomic stability and keeping urothelial growth in check. Structural and functional defects in p53 are found in over one half of human urothelial carcinomas, contributing to genomic instability and numerous chromosomal aberrations. Mutations in p53 first affect one allele, followed by a second hit, which can be the mutation, deletion or methylation of the wild-type allele, completely disabling the function of this tumor suppressor gene (6). Consistent with this, the expression of p21 (WAF1), an important downstream target of p53, is downregulated in the majority of urothelial carcinomas that harbor p53 mutations (7). Several codons of the p53 gene seem to be preferentially mutated, including codons 280 and 285 (8). These specific mutations are rare in other epithelial tumors, thus it has been suggested that they result from an urothelium-specific carcinogen or carcinogenic event.

Prima-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) is a low-molecular weight compound identified in a cellular screening of a chemical library from the National Cancer Institute (National Institutes of Health, Bethesda, MD). It has been shown to suppress the growth of cells that harbor mutant p53, restoring sequence-specific DNA-binding, wild-type conformation and transcriptional transactivation to mutant p53. Prima-1 induces apoptosis in human tumor cells in a p53-dependent manner and suppresses the growth of human tumor xenografts carrying mutant p53 (9).

Here, we studied the effect of Prima-1 on T24 and RT4 bladder cancer cell lines, with mutated and intact p53 genes, respectively, and analyzed whether this compound was able to induce p53 activity after UVC damage. We evaluated whether exposing

p53-intact (RT4) and p53-mutated (T24) cells to Prima-1 and UVC altered the expression of genes downstream of p53 related to apoptosis induction.

Materials and Methods

Cell lines and Treatment

Human urothelial carcinoma T24 (p53 mutant) cells were kindly provided by Dr. Salvadori (Botucatu, Brazil). RT4 (p53 wt) urothelial carcinoma primary bladder cells from a human Caucasian were purchased from EACC (Salisbury, UK). The cell lines were cultured in McCoy's medium supplemented with 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, St.Louis, MO, USA) under an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. For experiments, T24 and RT4 were seeded into 25 cm² tissue culture flasks and maintained at 37°C / 5% CO₂ overnight to allow cells to adhere. The next day, the cells were exposed to 253.7 nm UVC for 2 h to induce DNA damage. UVC radiation causes specific lesions in DNA and is therefore an easily implemented method, as the majority of germicidal lamps emit light UVC (10). After exposure, the cells were treated with 50 µM Prima-1 (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 1 to 192 h.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was isolated using the *mirVana*TM Kit (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The T24 and RT4 cell lines were cultured in McCoy's medium supplemented with 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, St.Louis, MO, USA) under an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260/280 nm using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA was generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA). The reactions were incubated at 25 °C for 10 min, followed by 37 °C for 120 min and 85 °C for 5 min. The cDNA was stored at -20 °C until further use.

Quantitative Real-Time PCR and Gene Expression

The expression levels of thirteen genes (Table 1) were analyzed by qRT-PCR using an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Target sequences were amplified in a 10 µl reaction containing 5 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.5 µl of TaqMan Gene Expression Assays (primers and probes, see Table I), 1 µl of cDNA and 3.5 µl of DNase-free water. The PCR cycling conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and then 40 cycles of 15 seconds each at 95 °C and 1 min at 60 °C. A TaqMan B2M assay was used as the endogenous control β2 microglobulin.

We used the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method to calculate the relative expression of the thirteen target genes using the formula $2^{-\Delta\Delta CT} = (\text{CT target gene, T24 and RT4 after 1 h, 18 h and 192 h exposed to Prima-1 at a 50-}\mu\text{M concentration - CT endogenous control, same conditions}) - (\text{CT target gene, T24 and RT4 without Prima- 1 - CT endogenous control, same conditions})$. The fold change in gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Evaluation of the mitochondrial membrane potential by DePsipher

The DePsipher kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) was used to measure the mitochondrial membrane potential under a fluorescence microscope (11, 12). T24 and RT4 cells ($2 \times 10^5/\text{ml}$) were seeded in a 24-well plate 24 h prior to the experiments. The plate was then exposed to 253.7 nm UVC for 2 h to induce DNA damage. Prima-1 (50 μM) was added, and 18 h later, the cells were washed with PBS and detached from the cell culture wells with trypsin. As a control, we used T24 and RT4 cell lines exposed to UVC for 2 h without treatment. The cells were incubated in the dark with DePsipher (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl carbocyanin iodide) solution at a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ for 30 min at 37°C, washed with reaction buffer with stabilizer, placed on a glass slide and covered with a glass coverslip. The stained cells were observed under an inverted fluorescence microscope using a fluorescein long-pass filter (fluorescein and rhodamine). DePsipher allows visualization of the potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from red (590 nm) to green (530 nm).

Analysis of apoptosis

Morphological aspects of the cells were analyzed and photographed. For DNA ladder analysis, DNA was isolated with QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA fragments were separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and visualized under UV light after staining with ethidium bromide Solution (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). The fragments were compared to a 100-bp DNA ladder marker (QIAGEN, Hilden, Germany)

Results

Gene expression profile

The profile of gene expression after exposure to Prima-1 in both cell lines is presented in Figure 1.

Prima-1 and apoptosis

Important genes induced by p53, Pmaip1 and Bbc3, which transcribe Noxa and Puma respectively, are essential for apoptosis induction. Noxa was shown to be induced at time zero and 1 h in T24 cells, whereas in RT4 cells, the expression of Noxa was detected at 1 and 18 h. Puma was not detected in RT4 cells, but was overexpressed in T24 cells at 18 h.

Bak and Bax oligomerize and alter the permeability of the mitochondrial membrane by releasing cytochrome c-activating caspases. In our model, only Bax was expressed by T24 cells after 18 h, while Bak was not expressed by the T24 cells at any of these time points. In the wt p53 RT4 cells, however, Bak was expressed and Bax was not.

Caspase 9, apaf-1 and cytochrome-c, genes involved in the activation of the caspase cascade, were progressively overexpressed in RT4, but in T24 cells, they were more highly expressed at time 0 and maintained upregulation at 1 h with a further increase in expression at 18 h. Caspase 2 is considered an orphan caspase and has been accepted as another initiating caspase. We observed a progressive overexpression of caspase 2 in both T24 and RT4 cells. Expression analyses of the effector caspases 7 and 3 showed a progressive upregulation in both cell lines, with a peak at 18 h.

Prima-1 and p53 activation

To show that the apoptosis induction was related to the reestablishment of p53 transcription activation, we evaluated the expression of other important genes regulated by p53, MDM2 and p21. We found that with Prima-1 treatment, p21 and MDM2 were both expressed in RT4 cells at low levels as compared to T24 cells.

After exposure to UVC and Prima-1, p53 was immediately overexpressed in the wt p53 RT4 cell line. The same level of expression was detected after 18 h in the mutant p53 T24 cell line.

Evaluation of the mitochondrial membrane potential by DePsipher

In the T24 cell line treated with 50 μ M Prima-1 there was disruption of the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) similar to what was observed in the RT4 cells exposed to UVC. T24 cells not treated with Prima-1 did not demonstrate disruption of $\Delta\Psi_m$ (Figure 2).

Morphological analysis and DNA fragmentation detection

After 2 h of exposure to UVC radiation, followed by 18 h of treatment with Prima-1 at 50 μ M, we observed morphological changes in both the T24 and RT4 cell lines. These changes were exacerbated by increasing the exposure time to Prima-1 (Figure 3). DNA ladder analysis demonstrated that DNA fragmentation occurred in T24 and RT4 cells only after 192 h of treatment (Figure 4).

Discussion

In this study we have shown that Prima-1 induces apoptosis in a p53-mutated bladder cancer cell line by reestablishing p53 transcription activity in these cells.

Noxa was shown to be induced at times zero and 1 h in T24 cells, while in RT4 cells, the expression of Noxa was detected in times 1 and 18 h. Puma was not detected in RT4 cells but was overexpressed in T24 at 18 h. Bak and Bax oligomerize, thereby altering the permeability of the mitochondrial membrane and releasing cytochrome c-activating caspases. In our model, only Bax was expressed by T24 cells after 18 h, while Bak was not expressed at any time. In contrast, in wt p53 RT4 cells, Bak was expressed but Bax was not. A recent study has shown that p53 participates in the intrinsic cell death pathway through the induction of Bax, Puma and Noxa (13). Thus, we can argue that in our model, where T24 was exposed to UVC containing Prima-1, the induction of the intrinsic apoptosis pathway was restored by recovery of p53 transcriptional function and induction of Noxa, Puma and Bax expression.

Transcribed by Pmaip1 and Bbc3 respectively, Noxa and Puma are important genes induced by p53 and are considered to be essential mediators of the apoptotic arm of the p53 pathway (14, 15).

In studies with knockout mice, some authors have demonstrated that Puma plays an important role in p53-mediated apoptosis in a wide range of cell types (15-17) while the role of Noxa in this model of apoptosis has been restricted to fibroblasts (18). Loss of Puma has a dramatic effect on the sensitivity of different cell types to p53-induced cell death. (16, 19) indicating that Puma is a crucial mediator of apoptosis in response to p53. Lomonosova et al. (20) demonstrated that other BH3 proteins such as Puma, in conjunction with p53, could overcome the dependence on Bax and Bak in mediating cell death. As we have seen, the expression of Puma but not Bax, and the isolated expression of Bak independent of Bax was sufficient to induce apoptosis, our data support Bax/Bak-independent cell death. Alternatively, in the RT4 wt p53 cell line, we have seen apoptosis independent of the expression of Puma. In contrast to the

1 mechanism of apoptosis induction described above, with cisplatin treatment,
2 phosphorylation and stabilization of p53 activates the expression of Fas, Puma and
3 Caspase-10 (21).
4

5 A critical event for apoptosome assembly is the release of cytochrome c from the
6 mitochondria, a step tightly regulated by members of the B cell lymphoma 2 (Bcl-2)
7 protein family (22). This family is composed of three subfamilies, depending on the
8 number of Bcl-2 homolog (BH) domains that they present. Bcl-2 is most well-known
9 member of the antiapoptotic subfamily consisting of members with the BH4. The two
10 other subfamilies are proapoptotic in nature, either lacking the BH4 domain (Bax, Bak)
11 or displaying only BH3 (BH3-only). Once the BH3-only family is activated, they
12 overcome the inhibitory effect of the antiapoptotic Bcl-2 family proteins, enabling the
13 oligomerization of Bak-Bax within the mitochondrial outer membrane (MOM). Our
14 results showed differences regarding the involvement of Bak and Bax, the first acted in
15 apoptosis in RT4 and the second in T24. Alternative routes shown by others helped us
16 to understand these discrepant results. Lei et al. (23) have shown that gossypol, a natural
17 polyphenolic compound found in cotton seeds that is used in infertility testing, is able to
18 induce mitochondrial membrane rupture, subsequently releasing cytochrome c
19 independent from Bax or Bak. Green (24) postulated the existence of two alternative
20 routes for the release of cytochrome c. The first is the activation and oligomerization of
21 Bax to interact with other proteins of the mitochondrial membrane leading to release of
22 cytochrome-c. The second is the opening of mitochondrial pores and nonspecific release
23 of cytochrome-c. Claveria et al. (25), in an experimental study with $\text{bak}^{-/-} \text{bax}^{-/-}$ mice,
24 found the preservation of programmed cell death.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 In a study published by Biegging et al. on deconstructing p53 transcriptional
43 networks in tumor suppression, the lack of Bax and Puma was not sufficient to diminish
44 apoptosis in some cell types, which could explain the occurrence of apoptosis in the cell
45 line RT4 even in absence of these proteins (13).
46
47
48

49 Caspase-9 is an initiator caspase and is thus involved in initiation of the
50 proteolytic cascade associated with the intrinsic pathway of apoptosis (26, 27). Once
51 activated, caspase-9 cleaves and activates effector caspases 3 and 7 that are required for
52 proteolysis and subsequent cell death (28). Analyzing the initiators of apoptosis
53 (caspase 9, apaf-1 and cytochrome-c) responsible for activation of the caspase cascade,
54 we demonstrated that there was upregulation of these genes in both cells lines RT4 p53
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 wt, and in T24 mutant p53 Prima-1 treated cells. In the T24 cell line there was a peak of
2 caspase-9 expression after exposure to UVC radiation, followed by a gradual decrease
3 in expression level, while in RT4 the peak occurred later. Analyzing the effector
4 caspases, both caspase 7 and 3 were progressively increased in both cell lines with a
5 peak in time 18 h. Thus, we showed that Prima 1 was able to effectively induce
6 apoptosis in a p53 mutated bladder cancer cell line.
7

8
9
10 Caspase 2 ,is the most evolutionarily conserved of all caspases (29) and although
11 there is a large literature on the role of caspase-2 in apoptosis, there is much controversy
12 regarding this protein, making it difficult to correctly place caspase-2 in the apoptotic
13 cascade. Hence, its role in apoptosis remains unclear, thus it is designated as an orphan
14 caspase. Although caspase-2 shares some substrate specificity with the executioner
15 caspases (30, 31) in many ways it is considered to be an initiator caspase. Caspase-2
16 has been shown to cleave the pro-apoptotic Bcl2 family member Bid (32). This is
17 generally considered to be the mode through which caspase-2 initiates apoptosis. We
18 also observed progressive overexpression of caspase 2 in both cell lines T24 and RT4,
19 confirming the data published by Shen et al. (2008) demonstrating that caspase 2 plays
20 an important role in the intrinsic apoptosis mediated by p53 promoting the translocation
21 of Bax to the mitochondria, a key step for the release of cytochrome c (33).
22
23

24
25 The loss of mitochondrial membrane potential in the T24 cell line occurred after
26 18 h of treatment with Prima-1, demonstrating that this mechanism is a direct target of
27 action of this compound, confirming the findings of Shen et al (33).
28
29

30
31 The morphological features observed in the T24 and RT4 cell lines after 24 h of
32 treatment with Prima-1 shows the morphological changes that became more pronounced
33 with increasing treatment time. DNA fragmentation in both strains was demonstrated
34 only very late, after 192 h.
35
36

37
38 To show that the apoptosis induction was related to the reestablishment of p53
39 transcription activation, we evaluated the expression of other important genes regulated
40 by p53, MDM2 and p21. We found that with Prima-1 treatment, p21 was expressed in
41 RT4 at lower levels compared to T24; the same was noted for MDM2. These results
42 allow us to speculate that Prima-1 was actually able to restore p53 function, because
43 after treatment of T24 cells (mutant p53), we observed increased expression of p21 and
44 MDM2, important genes activated by p53. The gradual increase in expression of p21
45 after exposure to UVC radiation and subsequent treatment with Prima-1 are further
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

evidence of the restoration of p53, as the activation of p53 induces the expression of many proteins, including p21 (34). A study reported by Messina et al. studied the effect of Prima-1 in thyroid cancer cells, and also showed an increase in p21 expression following treatment with this compound (35).

Evaluation of p53 expression in cell lines exposed to UVC and Prima-1 demonstrated that p53 was overexpressed immediately after exposure in RT4 wt p53 cell line but the same level of expression was detected after 18 h in T24 mutant p53 cell line. However, the level of p53 expression in T24 cells after treatment is significantly lower than that found in RT4. Our findings also revealed that Prima-1 acted by increasing the levels of p53 mRNA in p53 wt cell line. The mechanism involved in this phenomenon has not been reported and warrants further study.

No data have been reported in the English literature showing Prima-1 activity in bladder cancer cell lines. Mutation of p53 is extremely common in high-grade invasive urothelial carcinoma and there is a lack of good therapeutic options in these cases (36). The possibility of restoring p53 activity would be of great interest and the possibility of using it intravesically is tempting.

In conclusion, we have shown that Prima-1 is able to reactivate p53 function in a p53-mutated bladder cancer cell line by promoting apoptosis, inducing expression of Bax and Puma, activating the caspase cascade, DNA degradation and disruption of mitochondrial membrane independent of Bak, in the T24 cell line (p53 mutant). We propose in vivo experimental trials using Prima-1 as a new therapy for high grade bladder cancer.

Acknowledgements: This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Conflicts of interest:

We are submitting the article “The role of Prima-1 in apoptosis induced by UVC in bladder cancer cell lines” for publication in Apoptosis.

The authors state the following:

- 1) All authors have made a substantial contribution to the information or material submitted for publication.
- 2) All have read and approved the final manuscript.
- 3) There are no direct or indirect commercial financial incentives associated with publishing the article.
- 4) The manuscript or portions thereof are not under consideration by another journal or electronic publication and have not been previously published.
- 5) The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Srougi M. (2000) Câncer de Bexiga em dó menor.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
3. Debra T. Silverman SSD, Lee E. Moore, Nathaniel Rothman. (2006) Bladder Cancer. In: David Schottenfeld JFF, Jr. (ed). *Epidemiology and Prevention*, 3 edn. Oxford University Press, New York, pp. 1101-1127.
4. Cote RJ, Datar RH. (2003) Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 46 Suppl:S67-83.
5. Cordon-Cardo C. (2008) Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nephrol Suppl*:154-165.
6. Cordon-Cardo C. (1998) Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surv* 32:115-131.
7. Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, et al. (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res* 8:171-179.
8. Feng Z, Hu W, Rom WN, Beland FA, Tang MS. (2002) 4-aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human p53 gene. *Carcinogenesis* 23:1721-1727.
9. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8:282-288.
10. Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF. (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res* 681:197-208.
11. Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B, Paradysz A, Krol W. (2010) Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. *Molecules* 15:5336-5353.
12. Szliszka E, Zydowicz G, Janoszka B, Dobosz C, Kowalczyk-Ziomek G, Krol W. (2011) Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol* 38:941-953.
13. Biegging KT, Attardi LD. (2012) Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in Cell Biology* 22:97-106.
14. Nakano K, Vousden KH. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.
15. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, et al. (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4:321-328.
16. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, et al. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038.
17. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, et al. (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106:4131-4138.
18. Shibue T, Takeda K, Oda E, et al. (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17:2233-2238.
19. Vousden KH. (2005) Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309:1685-1686.
20. Lomonosova E, Ryerse J, Chinnadurai G. (2009) BAX/BAK-independent mitoptosis during cell death induced by proteasome inhibition? *Mol Cancer Res* 7:1268-1284.
21. Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ. (2009) Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *Int J Oncol* 35:401-416.

22. Youle RJ, Strasser A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.
23. Lei X, Chen Y, Du G, et al. (2006) Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *FASEB J* 20:2147-2149.
24. Green DR. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.
25. Claveria C, Martinez-A C, Torres M. (2004) A Bax/Bak-independent mitochondrial death pathway triggered by Drosophila Grim GH3 domain in mammalian cells. *J Biol Chem* 279:1368-1375.
26. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
27. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
28. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.
29. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9:358-361.
30. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, et al. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272:9677-9682.
31. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, et al. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272:17907-17911.
32. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277:13430-13437.
33. Shen J, Vakifahmetoglu H, Stridh H, Zhivotovsky B, Wiman KG. (2008) PRIMA-1MET induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene* 27:6571-6580.
34. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
35. Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, et al. (2012) Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer* 130:2259-2270.
36. Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.

Figure Legends

Figure 1. Gene expression profile of MDM2, Puma, Bax, Noxa, Casp9, Casp7, Casp3, Casp2, p53, Apaf-1, p21, cytochrome-c in T24 (p53 mutant) and RT4 (p53 wt) after UVC radiatiton and treatement with Prima-1 for 1 h and 18 h compared to control.

Figure 2. Evaluation of $\Delta\Psi_m$ by DePsipher. (A) RT4 exposed to UVC without Prima-1. (B) RT4 exposed to UVC treated with Prima-1 for 18 h. (C) T24 cell line exposed at UVC without Prima-1. (D) RT4 exposed to UVC treated with Prima-1 for 18 h.

Figure 3 . Microscopic aspect of T24 before exposure to UVC (A) and 192 hours after exposure to UVC and Prima 1 (B). RT4 before exposure to UVC (C) and after 192 hours exposed to UVC (D). Both cell lines show the same aspect related to apoptosis as loss of cell cohesion and cytoplasmic bubling suggesting that Prima 1 restores apoptosis induction in a p53 mutated cell line.

Figure 4. DNA fragmentation characterizes apoptosis in T24 and RT4 bladder cancer cell lines after treatment with Prima-1.

Table 1. Assays identifiers (IDs) used for qRT-PCR