CLARISSA RIBEIRO REILY ROCHA

Mecanismos de resistência à
quimioterápicos em células tumorais

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto
Butantan / IPT, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CLARISSA RIBEIRO REILY ROCHA

Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan
/ IPT, para obtenção de Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rocha, Clarissa Ribeiro Reily.

Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais /
Clarissa Ribeiro Reily Rocha. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Resistência à quimioterápicos.

Versão do título para o inglês: Mechanisms of resistance to
chemotherapy in tumor cells.

1. Câncer 2. Quimioterápico 3. Glioma 4. Melanoma 5. Glutathione
6. Resistência I. Menck, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0178/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Clarissa Ribeiro Reily Rocha.

Título da Tese: Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais.

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

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

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **018** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carlos Frederico Martins Menck**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Emprego do gene repórter luciferase para determinação de atividade de reparo de DNA em células animais*" do qual participam o(s) **Débora Vieira Braga, Clarissa Ribeiro Reily Rocha, Carolina Quayle e o pesquisador José Ernesto Belizário**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **29.05.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 31 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos amores da minha vida Alexandre, Luisa e Beatriz

AGRADECIMENTOS

Lembro-me muito bem do dia em que entrei na sala do Menck, bastante receosa e falei: Menck eu quero fazer o melhor doutorado possível, mas tenho uma coisa para te contar: eu estou grávida. Aí ele me fala: essa é a melhor notícia do dia! Esse episódio resume bem o quão generoso e humano o Menck é.

Eu tenho certeza que fiz o melhor doutorado possível. E não é contado pelos resultados ou trabalhos publicados em revistas científicas. Fiz o melhor doutorado possível por que estava em um dos melhores laboratórios de pesquisa do país, cercada de pessoas incríveis, que proporcionavam um ambiente de trabalho muito vibrante e prazeroso. Podendo contar com uma infraestrutura sem igual. E tendo total liberdade e incentivo de um orientador genial!

Gostaria de agradecer primeiramente ao Menck pela sua generosidade em ter me aceito no seu disputado lab. Muito obrigada pelos momentos de profunda discussão científica, pelos puxões de orelha, para que eu mantivesse o foco.

De forma mais que especial gostaria de dizer muito obrigada ao grande amor da minha vida, meu marido Alexandre, o verdadeiro responsável por eu ter feito doutorado. Foi ele que me introduziu nesse mundo fascinante da ciência há 15 anos quando veio com a cantada própria de um físico: você sabia que o sol é verde?.

Desde então tenho tido o grande privilégio de ser sua companheira, construímos uma família e uma história muito bacana juntos, da qual tenho muito orgulho. Alexandre que mais do que ninguém me incentivou e me apoiou durante esse doutorado. Obrigada por ser um excelente pai, por estar presente quando eu não podia, por ouvir meus lamentos sobre meus experimentos frustrados, por ficar animado junto comigo com uma nova ideia ou resultado. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Obrigada a minhas pequenas Luísa e Beatriz pelo amor incondicional. Obrigada por entenderem a minha ausência durante vários finais de semana, quando eu estava na minha escolinha. Obrigada aos meus queridos pais que desde cedo lá no interior da Bahia muito me incentivaram a estudar, a buscar novos horizontes. Fico feliz em olhar para traz e perceber

que todo o sacrifício de ter deixado a minha casa para estudar na capital aos 12 anos de idade valeu muito a pena.

Obrigada aos amiguinhos e amiguinhas de lab, pelos momentos de descontração na copa e fora do lab! Obrigada em especial a Lígia, Natália, Camila, Letícia, Juliana, Débora, Luciana, Marioly, Annabel, Ale, Alessandra, Leo, Satoru, Veri, Marinas, Francisco, Huma, Rodrigo, Janu, Rosa

Gostaria de agradecer também a Profa. Vanessa Gottifredi, do Instituto Leloir de Buenos Aires e a Profa. Leona Samson do Massachusetts Institute of Technology (MIT) por ter me recebido em seus laboratórios, foi um período de intenso aprendizado que certamente contribuiu enormemente para minha formação acadêmica.

Agradeço também a Universidade de São Paulo, seus docentes e funcionários, que proporcionaram uma excelente infra-estrutura para a realização dessa Tese. Agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento dos insumos e claro pela concessão da bolsa de doutorado!

Por fim, agradeço a minha Bahia que já me deu régua e compasso!

“The task is...not so much to see what no one has yet seen; but to think what nobody has yet thought,
about that which everybody sees.”

(Erwin Schrödinger - What is Life?)

RESUMO

Rocha CRR. Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e o fator limitante na terapia antitumoral é a resistência a processos terapêuticos. Diversos são os mecanismos que regem a resistência à drogas antitumorais sendo que várias delas podem ser tecido ou droga específico. Sendo assim, é de fundamental importância desvendar os mecanismos envolvidos na quimiorresistência para eliminá-lo e ter-se uma melhor eficácia terapêutica. Nesse trabalho investigamos os mecanismos que determinam resistência a cisplatina em células de glioma. Para tanto, 4 linhagens de glioma com diferentes *status* de p53 foram utilizadas. Primeiramente, nós mostramos que a resistência celular a cisplatina era independente de p53 bem como da capacidade de reparo de DNA dessas células. Tão pouco, a diferença de expressão de canais transportadores não estava por trás da resistência. Por outro lado, foi demonstrado que os níveis de glutathione (GSH) dentro da célula agiam como uma barreira para o efeito da cisplatina, reduzindo o dano de DNA em células tratadas. Também, a depleção de GSH pelo inibidor da síntese de GSH (BSO) tanto no modelo *in vitro* quanto *in vivo* sensibilizaram as linhagens celulares de glioma ao tratamento com cisplatina. Interessantemente, BSO também potencializou a citotoxicidade da temozolamida (TMZ), importante quimioterápico utilizado contra gliomas. Assim, a combinação de BSO, cisplatina e TMZ acabou sendo uma abordagem extremamente poderosa para otimizar a citotoxicidade em gliomas, assim provendo uma alternativa excitante para o tratamento de pacientes com glioma. Em seguida, analisamos os fatores de resistência a TMZ mais a fundo. Observamos que a linhagem de glioma resistente a essa droga (U138MG), tinha maior proteção antioxidante uma vez que mostrou menores níveis de geração de ROS após tratamento com TMZ e peróxido de hidrogênio. Além disso, apresentou uma maior expressão do fator de transcrição NRF2 assim como dos seus genes alvo como GCLM e GST π , envolvidos na geração e utilização de GSH. Foi verificado que em células silenciadas para NRF2 também foi observada a sensibilização frente ao tratamento com TMZ. Observamos também que havia maior indução de dano no DNA e morte celular pela adição do inibidor da atividade da GST ou BSO, indicando que a GSH tem papel decisivo na resistência a TMZ. Importante destacar que independente de qual seja o papel de GSH (detoxificação ou neutralização de ROS) a depleção de GSH pelo BSO elimina esse fator de resistência. Utilizando modelo *in vitro* e *in vivo* de células melanoma murino mostramos que BSO potencializa a citotoxicidade de TMZ, demonstrando que o regime terapêutico de combinação entre BSO e TMZ é também eficaz em outro modelo tumoral, tão devastador quanto glioma. Assim, a combinação de TMZ e BSO apresenta-se como uma alternativa animadora de tratamento terapêutico para os pacientes com glioma e melanoma.

Palavras-chave: Quimioterapia adjuvante. Resistência. Câncer. Danos no DNA.

ABSTRACT

Rocha CRR. Mechanisms of resistance to chemotherapy in tumors cells. [PhD Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Cancer is one of main cause of death worldwide and the limiting factor is antitumoral therapy resistance. Several mechanisms command drug resistance and many of them can be tissue or drug specific. Thus, a fundamental question is how is to unveil the mechanisms involved in chemoresistance to then eliminate it in order to achieve a better therapeutic efficacy. In this work we investigated the mechanisms of cisplatin resistance in glioma cells, using four distinct glioma cell lines, bearing different p53 status were used. Firstly, we demonstrated that cisplatin resistance was p53 independent and was not related to DNA repair capacity nor to different transport channel expression. On the other hand, it was demonstrated that glutathione (GSH) inside the cells was identified as a main barrier to cisplatin cytotoxicity, once it reduced the DNA damage on cisplatin treated cells. Also, GSH depletion by the synthesis inhibitor (BSO) sensitized the glioma cell lines to cisplatin treatment, observed in the *in vitro* as well as *in vivo* models. Interestingly, BSO also potentiated cytotoxicity by temozolomide (TMZ), a drug highly used to treat glioma. Thus, combination of BSO, cisplatin and TMZ ends up being an extremely powerful strategy to optimize the killing of glioma cells, thus providing an exciting alternative therapeutic protocol to glioma patients. Next, we analyzed TMZ resistance factors carefully. We observed that the TMZ resistant glioma cell line (U138MG), counted with higher antioxidant protection once it showed lower levels of reactive oxygen species (ROS) upon TMZ and hydrogen peroxide treatment. Moreover, U138MG displayed a high expression of the antioxidant transcription factor NFR2 as well as its target genes such as GCLM and GST π , involved on GSH generation and utilization. In fact, we observed that NFR2 silencing greatly enhanced cell death upon TMZ treatment. Also, we observed higher levels of DNA damage and cell death when BSO or GST π inhibitor was added to medium in combination to TMZ when compared to TMZ as a single agent, indicating that GSH has a decisive role on TMZ resistance. Thus regardless the actual role of GSH (detoxification or ROS neutralization) its depletion by BSO eliminates this resistance factor. In addition, BSO potentiated the TMZ killing in human and murine melanoma using *in vitro* and *in vivo* models. Thus, the therapeutic regimen of BSO and TMZ is also efficient for another tumor model, melanoma, as devastating as glioma. Therefore, the combination of BSO and TMZ is presented as an interesting therapeutic alternative approach for the treatment of glioma and melanoma tumors.

Keywords: Adjuvant chemotherapy. Resistance. Cancer. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos agentes genotóxicos, lesões de DNA mais comuns e principais vias de reparo de DNA	21
Figura 2. Principais mecanismos de resistência a quimioterápicos	24
Figura 3. Representação esquemática do método de quantificação de glutathiona intracelular utilizando o GSH-Glo GSH Assay Kit	44
Figura 4. Reações de bioluminescência catalisadas pelas luciferases de Firefly e Renilla	48
Figura 5. Sistema de plasmídeos para a produção lentiviral	49
Figura 6: Principais lesões no DNA causadas por cisplatina	55
Figura 7. Sensibilidade celular frente ao tratamento com cisplatina	63
Figura 8. Efeito do silenciamento de p53 em células de gliomas tratadas com cisplatina	64
Figura 9. Expressão basal de CTR1 em células de glioma	65
Figura 10. Imunodeteção de γ H2AX após tratamento com cisplatina	66
Figura 11. Detecção de adutos de cisplatina por imunofluorescência	68
Figura 12. Capacidade de reparo de DNA em células de gliomas	70
Figura 13. Níveis de GSH em células de glioma	71
Figura 14. Modulação dos níveis de GSH por BSO e NAC	72
Figura 15. Respostas celulares frente ao tratamento com BSO ou NAC seguido de cisplatina.....	73
Figura 16. Lesões no DNA induzido por cisplatina em combinação com BSO ou NAC	74
Figura 17. Lesões no DNA genômico após tratamento com cisplatina e BSO	75
Figura 18. Respostas células frente ao tratamento com NAC, BSO e TMZ	77
Figura 19. Respostas células frente ao tratamento com NAC, BSO, cisplatina e TMZ	78
Figura 20. Citotoxicidade após tratamento com NAC, BSO, cisplatina e TMZ	79
Figura 21. Estabelecimento de tumor em animais <i>Nude</i> inoculados com U138MGLuc	79

Figura 22. Estabelecimento de tumor em animais <i>Nude</i> inoculados com U87MGLuc	80
Figura 23. Progressão do peso corporal dos camundongos submetidos ao tratamento com quimioterápicos	81
Figura 24. Efeito do tratamento da cisplatina, TMZ e BSO <i>in vivo</i>	82
Figura 25. Impacto na progressão tumoral do tratamento com diferentes combinações de quimioterápicos	84
Figura 26. Sobrevida dos animais com tumor xenográfico de glioma humano	85
Figura 27. Modelo proposto do papel de GSH na resistência a cisplatina e TMZ	92
Figura 28. Perfil de expressão de genes relacionados a GSH em células de glioma	99
Figura 29. Perfil de expressão de genes relacionados a GSH em células de glioma após tratamento com TMZ	100
Figura 30. Modulação dos níveis de NRF2 e de tiol após tratamento com TMZ	101
Figura 31. Geração de ROS após tratamento com TMZ e H ₂ O ₂ em células de glioma	102
Figura 32. Indução da concentração de tióis por TMZ	103
Figura 33. Geração de ROS após tratamento com BSO, NAC e TMZ	104
Figura 34. Dano no DNA após tratamento com TMZ e BSO	105
Figura 35. Silenciamento de Nrf2 na linhagem U138MG	106
Figura 36. Respostas celulares das linhagens U138MG e U138MG shNRF2 ao tratamento com TMZ	107
Figura 37. Sensibilidade das linhagens de glioma humano ao tratamento com TMZ, BSO e EZA.....	108
Figura 38. Sensibilidade das linhagens de melanoma humano ao tratamento com TMZ, BSO e EZA.....	109
Figura 39. Sensibilidade da linhagem de melanoma murino B16 ao tratamento com TMZ, BSO e EZA	109
Figura 40. Efeito na progressão tumoral de melanoma murino após tratamento com TMZ e BSO.....	111
Figura 41. Modelo proposto do papel de NRF2 na resistência a TMZ	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista das linhagens celulares empregadas neste projeto	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG: 8-oxoguanina

ARE: *Antioxidant Response Element* (elemento responsivo antioxidante)

ATM: Ataxia telangiectasia mutada

ATR: Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3

BER: *base excision repair* (reparo por excisão de bases)

BRCA1: *Breast Cancer gene 1*

BRCA2: *Breast Cancer gene 2*

BSA: albumina de soro bovino

BSO: *L-Buthionine (S,R)-sulfoximine* (butionina sulfoximina)

CCD: *charge coupled device*

Cis: cisplatina

CSC: *Cancer Stem Cells*

CTR1: *copper transporter 1* (canal transportador de cobre)

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

DDR: *DNA damage response* (Resposta ao dano no DNA)

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DPD: dihidropirimidina desidrogenase

DSB: *double strand breaks* (quebra dupla fita de DNA)

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EdU: 5-Etínil 2-deoxiuridina

FDA: *Food and Drug Agency*

GAPDH: gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase

GGR: *global genome repair* (reparo do genoma global)

GSH: glutationa

GST: glutationa S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HCR: *host cell reactivation* (reativação pela célula hospedeira)

HR: *homologous recombination* (recombinação homóloga)

ICL: *interstrand crosslink* (ligação cruzada intercadeia)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IR: *ionizing radiation* (radiação ionizante)

IVIS: *In Vivo Image System*

KEAP1: *Kelch-like ECH associated protein 1*

NAC: N-acetilcisteína

NER: *nucleotide excision repair* (reparo por excisão de nucleotídeos)

O6-meG: O6 metilguanina

MDR: *Multi-drug Resistance*

MGMT: O6-metilguanina-DNA metiltransferase

MMR: reparo de bases mal pareadas

MSI: *microsatellite instability* (instabilidade de microssatélites)

mt: mutado

NHEJ: *non-homologous end joining* (Reparo de Extremidades não Homólogas)

NRF2: *factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2)

OMS: organização mundial da saúde

PARP1: *Poly(ADP-ribose) polymerase 1* [poli (ADP-ribose) polimerase 1]

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia de polimerase

PI: *propidium iodide* (iodeto de propídeo)

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

SFB: soro fetal bovino

SSB: *single strand break* (quebra de fita simples)

TCR: *transcription coupled repair* (reparo acoplado a transcrição)

TLS: *translesion synthesis* (síntese translesão)

TMZ: temozolomida

UV: luz ultravioleta

wt: selvagem

XP: xeroderma pigmentoso

PREFÁCIO

Esta tese de doutorado teve como propósito a análise de diferentes mecanismos envolvidos na resistência a vários quimioterápicos em células tumorais e transformadas. Bem como na busca de alternativas terapêuticas para reverter a quimiorresistência.

Este trabalho está dividido em diferentes capítulos. O primeiro capítulo compreende introdução geral sobre quimioterápico, possíveis mecanismos de resistência das células tumorais, e uma breve descrição sobre os modelos tumorais adotados nesse estudo.

O capítulo 2 estão descritos a análise dos mecanismos de resistência a cisplatina em células de glioma com especial atenção ao mecanismo de detoxificação efetuado pela glutathione.

O capítulo 3 é uma extensão dos achados descritos no capítulo 2, mas agora abordando os possíveis mecanismos moleculares que estão relacionados com a maior expressão de glutathione nas células resistentes e a possível implicação da glutathione como mediador da resistência a temozolamida em células de glioma e melanoma.

No capítulo 4 estão contidas as conclusões gerais da tese, seguido das referências bibliográficas e súmula curricular relativa a atividade acadêmica desenvolvida durante todo o período do doutorado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO GERAL	
1.1	Danos e Reparo de DNA	20
1.2	Quimioterápicos	21
1.3	Mecanismos de Resistência a quimioterápicos.....	23
1.3.1	<i>Influxo/efluxo de drogas</i>	25
1.3.2	<i>Inativação da droga</i>	26
1.3.3	<i>Alterações dos alvos celulares da droga</i>	27
1.3.4	<i>Reparo de DNA</i>	28
1.3.5	<i>Respostas ao dano de DNA</i>	30
1.4	Câncer	32
	1.4.1 <i>Gliomas</i>	32
	1.4.2 <i>Melanomas</i>	34
2	OBJETIVOS	36

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1	Cultura Celular.....	37
3.2	Cultivo Celular	37
3.3	Drogas e tratamentos	38
3.4	Silenciamento gênico utilizando esiRNA	39
3.5	Viabilidade celular através de método colorimétrico – XTT.....	39
3.6	Análise de fragmentação de DNA (população sub-G1) e ciclo celular.....	40
3.7	Deteção de γ H2AX ou Caspase 3 ativada por citometria de fluxo	40
3.8	Deteção de adutos de cisplatina e γ H2AX por imunofluorescência.....	41
3.9	Western Blot.....	41
3.10	PCR em tempo real (RT-PCR).....	42
3.11	Quantificação dos níveis de glutathione intracelular.....	43
3.12	Quantificação de dano no DNA pela metodologia do PCR longo	44
3.13	Obtenção de bactérias eletrocompetentes	45
3.14	Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação	46
3.15	Clonagem da Luciferase e Renilla no vetor pShuttle	47
3.16	Ensaio de HCR (Host Cell Reactivation)	47
3.17	Clonagem do gene repórter Luciferase em vetor lentiviral	48
3.18	Obtenção de linhagens celulares que expressem luciferase (silenciamento por shRNA).....	49
3.19	Slot-Blot	50
3.20	Ensaio <i>in vivo</i>	50

3.21	Imageamento de bioluminescência <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	52
3.22	Quantificação de tiol total reduzido	53
3.23	Quantificação de ROS	53

CAPÍTULO 2

4 EXPLORANDO OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À CISPLATINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO

4.1	Cisplatina	54
4.2	Mecanismos de resistência a cisplatina.....	56
4.2.1	<i>O papel dos canais transportadores de cobre.....</i>	56
4.2.2	<i>O papel da glutathione</i>	57
4.2.3	<i>O papel do reparo de DNA</i>	58
4.2.4	<i>O papel da síntese translesão</i>	59
4.2.5	<i>O papel de p53</i>	60
4.3	Resultados	
4.3.1	<i>O status de p53 isoladamente não é suficiente para determinar sensibilidade a cisplatina em células de glioma.....</i>	62
4.3.2	<i>Não há expressão diferencial do CTR1 entre as linhagens de glioma</i>	65
4.3.3	<i>Menor quantidade de quebras no DNA na linhagem resistente após tratamento com cisplatina</i>	66
4.3.4	<i>Menor quantidade de adutos de DNA na linhagem resistente após tratamento com cisplatina</i>	68
4.3.5	<i>Reparo de DNA não está envolvido na resistência de U138MG</i>	69
4.3.6	<i>A linhagem U138MG possui maior quantidade de GSH</i>	71
4.3.7	<i>Depleção de GSH contorna a resistência a cisplatina na linhagem U138MG</i>	71
4.3.8	<i>BSO potencializa a citotoxicidade da cisplatina</i>	72
4.3.9	<i>BSO potencializa a citotoxicidade de cisplatina devido ao aumento de danos no DNA</i>	73
4.3.10	<i>Combinação de BSO, cisplatina e TMZ: efeito sinérgico in vitro</i>	76
4.3.11	<i>Combinação de BSO, cisplatina e TMZ: efeito sinérgico in vivo</i>	78
4.4	Discussão	86

CAPÍTULO 3

5 EXPLORANDO O PAPEL DA GLUTATHIONE NA RESISTÊNCIA A TEMOZOLAMIDA

5.1	Temozolamida	94
5.2	Mecanismos de resistência a TMZ	95

5.2.1 MGMT	95
5.2.2 BER	96
5.2.3 MMR	97
5.3 Resultados	
5.3.1 U138MG possui maiores níveis de mRNA de NRF2, GCLM e GST π do que U87MG	99
5.3.2 TMZ induz a expressão de mRNA de NRF2, GCLM e GST π	100
5.3.3 TMZ aumenta os níveis proteicos de NRF2	100
5.3.4 TMZ gera ROS intracelular	101
5.3.5 TMZ induz a produção de tióis	103
5.3.6 Aumento da geração de ROS após tratamento com TMZ e BSO.....	103
5.3.7 Aumento de lesões oxidativas no DNA genômico após tratamento com TMZ e BSO	104
5.3.8 Silenciamento de NRF2 sensibiliza a linhagem U138MG ao tratamento com TMZ	105
5.3.9 Inibidor de GST π , Ezatiostat (EZA), potencializa a morte celular induzida por TMZ	107
5.3.10 BSO potencializa a morte celular induzida por TMZ em linhagens de melanoma humano e murino	108
5.3.11 Inibição da progressão tumoral após tratamento com TMZ e BSO em modelo de melanoma murino	110
5.4 Discussão	112

CAPÍTULO 4

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Conclusões	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICE – Súmula curricular	146

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Danos e Reparo de DNA

A molécula de DNA, apesar de sua importante função biológica de conter e transmitir a informação genética das células, não é inerte. Na verdade o material genético está constantemente exposto a uma variedade de agentes genotóxicos que podem gerar lesões no DNA e consequentemente levar à instabilidade genética. As fontes potenciais de agentes genotóxicos incluem: 1) fatores endógenos, como os metabólitos ativos gerados pelo processo de respiração celular (e.g. espécies reativas de oxigênio [ROS, do Inglês, *Reactive Oxygen Species*]); 2) fatores exógenos como os agentes ambientais (e.g. luz ultravioleta [UV] e irradiação ionizante [IR, do Inglês, *Ionizing Radiation*]) ou agentes quimioterápicos (e.g. cisplatina e temozolamida, TMZ). Algumas lesões no DNA geram alterações estruturais no DNA que podem impedir os processos de transcrição e replicação no DNA, comprometendo assim, funções vitais para a célula (Lagerwerf et al., 2011).

Para lidar com essa enorme gama de lesões potencialmente deletérias, as células contam com complexos sistemas de reparo de DNA. De fato, sistemas de reparo de DNA são mecanismos de defesa ubíquos, e o seu bom funcionamento é crítico para a manutenção da integridade do genoma. Assim, frente a grande variedade de lesões no DNA as células dispõem de uma ampla gama de mecanismos para corrigi-las.

Os principais mecanismos de reparo por excisão que as células contam para reparar bases danificadas presentes em uma das fitas de DNA ou bases mau emparelhadas são: o Reparo por Excisão de Bases (BER, do Inglês *Base Excision Repair*), o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER, do Inglês *Nucleotide Excision Repair*), o Reparo de Emparelhamento Errôneo (MMR, do Inglês, *Mismatch Repair*) (Peterson, Côté, 2004). Além desses, as células possuem mecanismos específicos para o reparo de lesões que envolvem as duas fitas de DNA, ou seja, ligações cruzadas interfítas (ICL, do Inglês *Interstrand Crosslink*) ou quebras na dupla de DNA (DSB, do Inglês, *Double Strand Break*): Reparo de Extremidades não Homólogas (NHEJ, do Inglês, *Non-Homologous End-Joining*); e Recombinação Homóloga (HR, do Inglês, *Homologous Recombination*) (Huertas, 2010). Dessa forma, o reparo de diferentes tipos de lesões dependem de um conjunto de diferentes proteínas que podem interagir entre elas para formar uma rede de proteção do genoma celular (Hoeijmakers, 2001) (**Figura 1**).

Figura 1. Representação esquemática dos agentes genotóxicos, lesões de DNA mais comuns e principais vias de reparo de DNA. (A) Uma variedade de agentes genotóxicos originados de fontes endógenas (e.g. ROS) ou exógenas (e.g. UV) podem causar direta ou indiretamente diferentes tipos de lesões no DNA; (B) Lesões no DNA podem gerar grandes distorções na dupla hélice de DNA (e.g. dímeros de pirimidina ciclobutano [CPD]), pequenas alterações nos nucleotídeos (e.g. 8-oxoguanina [8-oxoG]), ICL, e ainda quebras simples (SSB,) ou duplas (DSB); (C) Os mais relevantes mecanismos de reparo de DNA responsáveis pela manutenção da integridade da molécula de DNA: BER, NER, MMR, HR e NHEJ. (Adaptado de (Rocha et al., 2013)).

1.2 Quimioterápicos

A maioria dos quimioterápicos clinicamente relevantes usados para combater o câncer tem como alvo biológico principal a molécula de DNA. Essas drogas causam uma plethora de lesões de DNA que se não reparadas prontamente induzem morte da célula tumoral. Em outras palavras, o principal mecanismo de citotoxicidade de agentes antitumorais é através do dano ao DNA.

O conceito de quimioterapia iniciou com os estudos de Paul Ehrlich para o tratamento de sífilis. No início do Século XX, ele desenvolveu o primeiro quimioterápico, conhecido como Salvarsan um derivado de arsênico (DeVita, Chu, 2008). Um conceito muito importante da quimioterapia preconizado por Ehrlich é o da Bala Mágica. Segundo ele, caso desenvolvêssemos uma droga que interaja com o alvo (bactérias, vírus ou células cancerosas) e não com o resto do organismo essa droga seria considerada uma Bala Mágica

(Strebhardt, Ullrich, 2008). Esse conceito permeia o racional do desenvolvimento terapêutico antitumoral desde então.

De fato a estratégia de desenvolvimento de novas drogas antitumorais baseia-se no fato de que células cancerosas possuem uma taxa de replicação muito maior do que células não tumorais e por tanto sofrerão mais fortemente os efeitos tóxicos da quimioterapia. Mais recentemente abordagens mais refinadas procuram desvendar quais mecanismos moleculares estão diferencialmente presentes entre a célula tumoral e a normal.

Um dos primeiros quimioterápicos usado como agente antitumoral foi a mostarda nitrogenada, uma droga derivada de gás mostarda que foi utilizada como arma biológica durante a Primeira Guerra Mundial. Foi observado que soldados expostos a gás mostarda apresentavam um grave quadro de supressão linfóide e mielóide (Krumbhaar, Krumbhaar, 1919). Louis Goodman e Alfred Gilman aproveitaram-se dessas observações e testaram um derivado de gás mostarda (mostarda nitrogenada) em pacientes com linfoma não-Hodgkin, obtendo efeitos antitumorais consideráveis (Karnofsky, 1958).

Em 1948, Sidney Farber observou que a administração de ácido fólico estimulava a proliferação de células cancerosas em crianças com leucemia linfoblástica aguda. Baseado nessas observações esses pacientes foram tratados com compostos antifolatos (como aminopterina ou metotrexato) sendo observada a remissão desse tipo de tumor (Farber et al., 1948).

A elucidação da estrutura de dupla hélice do DNA em 1953 (Watson, Crick, 1953) teve um impacto singular na estratégia de desenvolvimento de novas drogas antitumorais. Isso porque, baseando-se em aspectos estruturais do DNA foram desenvolvidas drogas que eram análogos de bases do DNA (como 5-fluorouracila [5-FU] ou 8-azaguanina) para interferir na replicação do material genético (Heidelberger et al., 1957).

Além disso, não só foram criadas drogas para inibir a síntese de DNA ou que lesionam diretamente a molécula de DNA – como os agentes alquilantes (como temozolamida [TMZ] ou mostarda nitrogenada) – como também drogas que agem na inibição do fuso mitótico (como docetaxel ou vincristina) ou na inibição da topoisomerase (como doxorrubicina ou irinotecano). Assim, baseando-se no conceito de balas mágicas, busca-se com os diferentes protocolos de quimioterapia ter como alvo principal o câncer, preconizando então a minimização dos efeitos colaterais para o paciente.

Quimioterapia é um dos principais modos de tratamento contra o câncer, entretanto a eficácia dessa terapia é bastante limitada pelo processo de resistência às drogas. De fato, foi verificado já com o próprio Salvarsan o surgimento de pacientes com sífilis resistentes a

quimioterapia (Zaffiri et al., 2012). E infelizmente, não foi diferente em relação a quimioterapia utilizada para combater o câncer.

Mas afinal quais são os mecanismos que determinam que uma célula seja resistente a um quimioterápico? Essa foi a questão central dessa tese de doutorado e será melhor explorada a seguir.

1.3 Resistência a quimioterápicos

Resistência a quimioterápicos pode ser tanto intrínseca como adquirida. No primeiro caso, é proposto que fatores que medeiam a resistência já estejam presentes entre as células que compõem o tumor o que tornaria a terapia ineficaz. Já no cenário de resistência adquirida é proposto que durante o tratamento do tumor, que era inicialmente sensível a droga, possam ocorrer mutações em algumas células tumorais, que ativariam vias de sinalização compensatórias, que possibilitando que essas células não mais respondam ao tratamento o que conferiria a elas vantagem proliferativa em relação a massa tumoral total (Holohan et al., 2013).

Estima-se que a resistência a quimioterapia é a causa de fracasso terapêutico em 90% dos pacientes com câncer metastático (Longley, Johnston, 2005). Assim, certamente se pudéssemos superar a resistência a drogas o impacto na sobrevida de pacientes seria imensa.

De fato, desde os primórdios da quimioterapia contra o câncer, muita atenção tem sido dada para tentar identificar quais mecanismos de resistência são responsáveis pelo fracasso terapêutico. Dessa forma, verificou-se que vários são os fatores que afetam a sensibilidade celular a uma determinada droga. Esses fatores incluem mecanismos que limitam a quantidade de droga que entra na célula (o influxo da droga) ou por outro lado a aumento do efluxo da droga para fora da célula; inativação ou inativação de processos envolvidos na ativação da droga; alterações que modificam os alvos celulares da droga; indução da otimização do processamento do dano causado pela droga (**Figura 2**) (Holohan et al., 2013).

Ademais, os tumores são altamente adaptáveis e a ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência e/ou a inativação da via indutora de morte está também intrinsecamente relacionado a quimiorresistência (Debatin, Krammer, 2004). Nesse sentido, mudanças epigenéticas e a influência do microambiente tumoral têm sido identificadas como importantes fatores que contribuem para a ineficácia de drogas antitumorais (Maier et al., 2005). Outro fator que tem sido cada vez mais aceito como fundamental para resistência a

quimioterápicos é a presença de células tronco cancerosas (CSC, do Inglês *Cancer Stem Cells*) na massa tumoral, uma vez que tem sido mostrado que CSC são intrinsecamente altamente resistentes a quimioterapia (Singh, Settleman, 2010; Valent et al., 2012).

Além disso, é preciso que se tenha sempre em mente que normalmente os tumores possuem um grau elevado de heterogeneidade celular e molecular, o que justificaria que resistência a drogas poderiam ocorrer devido a pressão seletiva induzida pelo tratamento em que um pequeno grupo de células resistentes estaria presentes no tumor original. Nesse caso há uma resposta inicial ao tratamento mas invariavelmente ocorre a recidiva do tumor, agora resistente ao tratamento com o quimioterápico utilizado (Swanton, 2012).

Figura 2. Principais mecanismos de resistência a quimioterápicos. Os mecanismos de resistência incluem: diminuição do influxo da droga para dentro da célula (por exemplo, pela diminuição da expressão de canais transportadores); aumento do efluxo da droga para fora da célula (por exemplo, aumento da expressão de canais de transporte a múltiplas drogas); aumento do processo de inativação da droga (por exemplo, pelo aumento da expressão da glutathione ou da glutathione S-

transferase); indução de alteração dos alvos da droga (por exemplo, modificações na topoisomerase impedindo a ligação de inibidores dessa enzima); aumento da capacidade de reparo de DNA (por exemplo, aumento da expressão de genes relacionados ao reparo por excisão de nucleotídeos); modificações epigenéticas (por exemplo, metilação no promotor de genes relacionados a morte por apoptose).

1.3.1 *Influxo/efluxo de drogas*

O mecanismo pelo qual quimioterápicos entram nas células dependem da sua natureza química e muitas deles invadem o ambiente intracelular utilizando-se de canais transportadores presentes na membrana plasmática celular. Assim, resistência pode ser causada por redução da expressão ou de mutações que possam modificar atividade de transportadores na superfície da membrana. Por exemplo, reduzida expressão de transportadores de folatos resultaram em diminuição da entrada de metotrexato (análogo tóxico do folato) *in vitro* (Wang et al., 2003) e também foi demonstrado que em crianças com leucemia mielóide crônica que expressavam menos canais transportadores de folato possuíam menores níveis de metotrexato nas células tumorais o que estava correlacionado com menor tempo de sobrevida (Laverdière et al., 2002).

Outro importante mecanismo de defesa contra a ação dos quimioterápicos é a eliminação da droga do ambiente intracelular. Para tanto, células lançam mão da ação de proteínas de membrana transportadoras que funcionam como bombas que fazem o efluxo da droga para fora da célula. A superfamília de proteínas transportadoras do tipo ABC (do Inglês *ATP-binding Cassette Protein*) regulam o transporte através da membrana celular de vários agentes quimioterápicos. Sendo que a proteína resistente a múltiplas drogas 1 (MDR1, do Inglês *Multi-drug Resistance*) também conhecida como glicoproteína-P é o membro dessa superfamília melhor descrito como estando relacionado com resistência a quimioterápicos e é responsável pela eliminação de várias drogas, como inibidores de topoisomerase e antimetabólitos (Bao et al., 2012). Superexpressão de MDR1 tem sido associado ao fracasso quimioterapêutico em vários tipos de câncer como por exemplo em células de câncer de próstata tratadas com doxorrubicina e paclitaxel (Lee et al., 2004); câncer de mama conferindo resistência a antraciclinas como doxorrubicina (Doyle et al., 1998); e superexpressão de MDR1 correlaciona com pior prognóstico de pacientes com câncer de pulmão metastático de pacientes tratados com cisplatina e etoposídeo (Triller et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que CSC de gliomas possuem altos níveis de expressão de transportadores do tipo ABC quando comparado com células do tecido

neuronal normal, configurando-se como um fator relevante para explicar a maior resistência a quimioterapia exibida pela CSC (Shervington, Lu, 2008).

1.3.2 Inativação da droga

Uma vez dentro da célula, a droga ainda pode passar pelo processo de detoxificação impedindo que esta reaga com seu alvo terapêutico. Por exemplo, mais de 80% do 5-FU é normalmente inativada pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) (Diasio, Harris, 1989). Foi verificado em modelo xenográfico de tumor coloretal humano que tumores resistentes a 5-FU possuem maior expressão de DPD (Li et al., 2013), e em concordância, foi verificado que o nível de expressão de DPD pode sim funcionar como marcador prognóstico para pacientes com câncer de mama submetidos ao tratamento com 5-FU e derivados (Horiguchi et al., 2002).

Glutathione (GSH) é um poderoso agente antioxidante que inibe o possível efeito deletério que ROS possam exercer em moléculas biológicas. Mas além do efeito antioxidante, GSH tem papel fundamental na detoxificação de agentes xenobióticos. Foi demonstrado que GSH pode ligar-se covalentemente pela ação enzimática da glutathione S-transferase (GST) a diferentes tipos de drogas, como por exemplo a cisplatina, resultando num complexo GSH-conjugado. A ATPase S-conjugado de GSH ou bomba GS-X (localizada na membrana plasmática), então exporta essas substâncias conjugadas com moléculas de GSH para o meio extracelular (GST) (Ishikawa, Ali-Osman, 1993).

Dessa forma, vários trabalhos identificaram a correlação entre altos níveis intracelulares de GSH e resistência a diversos quimioterápicos, como cisplatina (Chen, Kuo, 2010a; Meijer et al., 1992); antraciclina como doxorubicina (Zaman et al., 1995); e agentes alquilantes como melfalan (Mulcahy et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que tumores que expressam altos níveis de GST são mais resistentes a quimioterapia (Townsend, Tew, 2003).

1.3.3 Alterações dos alvos celulares das drogas

Alterações nos níveis de expressão ou mutações nos alvos dos quimioterápicos tem um grande impacto na quimiorresistência. Um bom exemplo para ilustrar esse mecanismo de resistência é o que foi observado com inibidores de topoisomerase (camptotecina e doxorubicina). Topoisomerase é a enzima responsável clivar e religar a dupla fita de DNA a fim de relaxar a molécula que foi tensionada pela abertura da dupla hélice durante o

processo de replicação do DNA. Inibidores de topoisomerase atuam estabilizando o complexo formado entre a topoisomerase e o DNA clivado, evitando assim a religação da molécula de DNA, o que pode levar a geração de quebras duplas de DNA e por fim a morte celular (Liu et al., 2000). Assim, foi verificado que diminuição da expressão, atividade e mutações que impedem a interação da droga com topoisomerases estavam correlacionados com resistência a camptotecina e doxorrubicina (Friche et al., 1991; Hofmann, Mattern, 1993; Li et al., 1996).

Outro exemplo é observado em relação a resistência a taxanos (como paclitaxel e docetaxel) e alcalóides (como vimblastina e vincristina) que têm como alvos terapêuticos microtúbulos, inibindo a sua polimerização e provocando assim inibição do processo mitótico o que leva a célula eventualmente a morte por apoptose (Dumontet, Sikic, 1999). Foi demonstrado que células são resistentes a esses quimioterápicos devido a mutações que levam a expressão de diferentes isoformas de microtúbulos que não mais são alvos para esses agentes (Kavallaris et al., 2001).

1.3.4 Reparo de DNA

Grande parte das drogas antitumorais utilizadas na clínica induzem danos na molécula de DNA tanto forma direta (como cisplatina e TMZ) como indiretamente (como 5-FU e inibidores da topoisomerase). A resposta celular ao dano no DNA é ou reparar o dano ou, caso não seja possível, indução da morte celular (Lord, Ashworth, 2012). Nesse sentido, a capacidade que uma célula tumoral tem de lidar com lesões do seu DNA configura-se como um mecanismo crucial no estabelecimento de resistência a vários quimioterápicos (Bouwman, Jonkers, 2012; Fojo, 2001).

Assim, inibição do reparo de DNA é uma estratégia terapêutica óbvia quando é utilizado quimioterápicos que interferem com a molécula de DNA. Ademais, os tumores frequentemente possuem disfunções em algum sistema de reparo de DNA. As vias de reparo não raro são redundantes em relação ao reparo de determinado dano, por exemplo quebras de duplas da fita de DNA podem ser reparadas tanto por NHEJ quanto pela via de HR. Assim, o fato de que as células tumorais apresentarem deficiências em alguma via de reparo, pode levar a uma completa dependência de vias alternativas de reparo de DNA, e essa via alternativa pode agora ser inibida levando a morte das células tumorais e minimizando os danos para as células normais do organismo. Esse é o conceito de letalidade sintética. Nesse tipo de abordagem terapêutica, são utilizados inibidores que têm como alvos componentes

da maquinaria de reparo de DNA em que as células tumorais sejam dependentes.

Um bom exemplo de letalidade sintética é a utilização inibidor da enzima poli (ADP ribose) polimerase (PARP, do Inglês *Poly(ADP-ribose) polymerase*) em células que são previamente identificadas como tendo genótipo BRCA1 e/ou BRCA2 (do Inglês, *Breast Cancer gene 1 and 2*) mutado. BRCA1 e BRCA2 estão envolvidos no reparo de DSB pela via de HR e mutações nesses genes levam a predisposição de câncer de mama e ovário. A enzima PARP participa no via de BER no reparo de quebras de fita simples de DNA (SSB, do Inglês *Single Strand Breaks*). Foi demonstrado que a presença do inibidor de PARP foi capaz de sensibilizar linhagens tumorais de câncer de mama e ovário duplo negativas para os genes *BRCA1* ou *BRCA2*, causando instabilidade cromossômica, parada de ciclo celular e consequente forte indução de apoptose (Farmer et al., 2005). Os autores sugerem que esse efeito seja possivelmente devido ao fato de que a inibição de PARP leva a persistência de quebras de SSB o que durante a replicação pode levar ao surgimento de DBS, que é uma lesão reparada por HR que é um sistema dependente de BRCA1 e BRCA2.

Diversos protocolos clínicos foram estabelecidos para tratamento de diferentes tipos de câncer utilizando inibidores de PARP (Ratnam, Low, 2007). Entretanto, resistência foi reportada em tumores BRCA2 mutados tratados com inibidores de PARP devido a mutação *de novo* em BRCA2 que foi capaz de parcialmente restaurar função de reparo de DNA, permitindo assim que a sobrevivência dessas células (Edwards et al., 2008; Sakai et al., 2008).

A via de MMR é crucial para a manutenção da integridade genômica, e mutações nos genes MLH1 e MSH2 da via de MMR podem levar a instabilidade de microssatélites (MSI, do Inglês *Microsatellite instability*). Assim, a perda desse sistema de reparo pode causar predisposição ao câncer e em células tumorais. A deficiência em MMR pode resultar em resistência a drogas antitumorais tanto diretamente pela inabilidade dessas células em detectar o dano no DNA e ativar a apoptose quanto indiretamente pelo aumento da frequência de mutação em todo o genoma, o que pode causar desregulação de várias vias moleculares que podem, por sua vez, contribuir para resistência a quimioterápicos. Assim, tem sido demonstrado que células deficientes no sistema MMR são resistentes a diversos quimioterápicos como procarbazona, TMZ, cisplatina, carboplatina, doxorubicina e etoposídeo (Fink et al., 1998). Por exemplo, foi demonstrado que a hipermetilação de *MLH1* garantiu que as células tumorais fossem resistentes a cisplatina e utilizando um agente desmetilante a resistência foi abolida (Plumb et al., 2000). Tem sido demonstrado que células MLH1 deficientes são mais resistentes a 5-FU, doxorubicina, epirrubicina e

camptotecina (Meyers et al., 2001; Fedier et al., 2001; Jacob et al., 2001). E um estudo clínico identificou deficiências em MMR como fator preditivo de resposta a camptotecina em câncer colorretal (Fallik et al., 2003).

A via de NER eficiente é necessária para o reparo de danos causados por uma grande gama de quimioterápicos como por exemplo agentes derivados de platina (cisplatina, carboplatina) e antraciclinas (doxorubicina) (Chaney, Sancar, 1996; Moraes et al., 2012).

A importância de NER é ilustrada pela descoberta que defeitos nessa via levam a hipersensibilização de tumores a cisplatina e por outro lado a restauração da atividade de NER reduz a sensibilidade a níveis normais (Furuta et al., 2002).

Um dos componentes mais versáteis da via de NER é a enzima ERCC1 (do Inglês, *Excision Repair Cross-complementing 1*) que é uma exonuclease que junto com XPF cliva fita de DNA na posição 5' contendo a lesão de DNA (Kirschner, Melton, 2010). Vários são os estudos pré-clínicos que demonstraram o papel decisivo de ERCC1 em determinar a sensibilidade a cisplatina (Ferry et al., 2000; Ferry et al., 2000; Usanova et al., 2010; Youn et al., 2004). Alta expressão de ERCC1 foi associado com pior resposta a quimioterápicos em pacientes com câncer de pulmão, ovário, gástrico e de testículo (Kwon et al., 2007; Lord et al., 2002; Olaussen et al., 2006).

Instabilidade genômica é uma das características das células de câncer, podendo levar a heterogeneidade tumoral e resistência a quimioterápicos. Instabilidade cromossômica, que compreende mudanças no número e estrutura dos cromossomos, é a forma mais comum de instabilidade genômica. Estudos pré-clínicos identificaram o papel da instabilidade cromossômica tanto na resistência intrínseca quanto na adquirida a drogas como os taxanos (Swanton et al., 2009). Um estudo recente destacou a importância da instabilidade cromossômica na resistência a drogas pela demonstração que a superexpressão de NEK2 (relacionados a manutenção da integridade genômica) estava associado com resistência em vários tipos de células tumorais ao tratamento com doxorubicina e etoposídeo e também foi verificado que pacientes com melanoma com superexpressão de NEK2 tinham pior prognóstico (Zhou et al., 2013a).

1.3.5 Resposta ao dano no DNA

Durante o processo de proliferação, células necessitam progredir através do ciclo celular, ultrapassando os pontos de paradas G1 e G2, os quais asseguram a duplicação de células saudáveis e viáveis. Então, caso durante a síntese de DNA as células forem expostas

agentes genotóxicos, o ponto de parada G1 é ativado levando a um atraso transiente da progressão da fase S, a fim de reparar lesões propriamente (Bartek, Lukas, 2003; Wrighton, 2009). Uma vez detectado o dano no DNA, as células iniciam o processo de resposta ao dano no DNA (DDR), o qual é composto de complexos proteicos que funcionam como sensores (e.g. ATM e ATR), mediadores (e.g. p53) e efetores (e.g. CHK1 e CHK2). A ação bem orquestrada dessas proteínas tem vários possíveis resultados. Uma das consequências da DDR é a parada do ciclo celular, pela ativação de pontos de paradas ou *checkpoints*. Subsequentemente, DDR induz remodelação da cromatina no sítio do dano do DNA, indução de expressão gênica e modificação postranscricionais de proteínas envolvidas no reparo de DNA (Rouse, Jackson, 2002). Todos esses eventos contribuem para a resolução do dano no DNA e consequentemente para a sobrevivência celular (Bernstein, Rothstein, 2009). Alternativamente, em casos em que há impossibilidade de reparar a lesão, as células podem ser levadas a senescência ou serem eliminadas por apoptose (Lord, Ashworth, 2012).

Entre as consequências de lesões não reparadas no DNA, ocorrem atrasos na progressão pelo ciclo celular, que podem ampliar o tempo para que essas sejam removidas (pontos de checagem de ciclo), ou, alternativamente, as células desencadeiam a ativação de morte celular, sendo apoptose o processo melhor conhecido (Lord, Ashworth, 2012). Esses processos são mediados por vias complexas de transdução de sinal, sendo que as quinases ATM e ATR atuam como os principais sensores de danos na molécula de DNA. Enquanto ATM responde primariamente a quebras duplas no DNA, a ATR responde principalmente a estresse replicativo, embora existam evidências de redundância dessas duas quinases no controle do ciclo celular (Cimprich, Cortez, 2008).

Entre as proteínas mediadoras das respostas a lesões no genoma, a supressora de tumor p53 também desempenha um papel central. A proteína p53 é um fator de transcrição que se liga a sítios específicos do DNA sendo capaz de ativar a transcrição de uma enorme variedade de genes (Oren, 2003). As proteínas codificadas por esses genes provavelmente encontram-se na casa das centenas e contribuem diretamente para efeitos biológicos de p53, dentre os quais se destacam a inibição do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (Sax et al., 2003).

Assim, em resposta a dano no DNA, p53 induz a transcrição de p21 e GADD45 que promovem a parada do ciclo celular (Ljungman, 2000). Entretanto, dependendo do contexto celular, p53 pode levar a eliminação celular pela indução de genes como Bax, NOXA, TRIAL e Fas desencadeando assim o processo apoptótico (Chipuk, Green, 2006). A parada do ciclo celular e o processo de apoptose têm o papel de tentar manter a integridade

genômica ou prevenção da transmissão de material genético danificado para células filhas, respectivamente. Vários são os modelos que tem sido proposto para explicar como células escolhem entre parada de ciclo e morte por apoptose. Um dos modelos propõe que a decisão de p53 de induzir apoptose está no nível e duração da ativação de p53 (Vousden, 2000). Outro modelo sugere que diferentes tipos celulares podem manter genes regulados por p53 em regiões de cromatina ativas, que determinaria o conjunto de genes que sofrem indução transcricional por p53 (Schmitt et al., 2000). Há ainda um terceiro modelo que propõe que a disponibilidade de co-fatores transcricionais é o que determinaria a habilidade de p53 em ativar diferente conjuntos de genes (Samuels-Lev et al., 2001).

1.4 Câncer

Os diversos tipos de tumores estão entre as principais causas de morte. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil 580 mil novos casos de câncer foram estimados para 2014, com um índice de fatalidade em torno de 20% desse total, sendo segunda principal causa de morte no país (Estimativa INCA 2014).

Existem mais de 100 tipos diferentes de cânceres e vários subtipos de tumores podem ser achados num mesmo tecido. O artigo seminal de Hanahan e Weinberg preconiza que há 6 características presentes em quase todos os tipos de tumores: I) potencial replicativo ilimitado; II) evasão a apoptose; III) angiogênese; IV) auto-suficiência dos sinais de crescimento; V) insensibilidade aos sinais antiproliferativos; VI) invasão dos tecidos e metástase (Hanahan, Weinberg, 2000). Posteriormente, em um outro artigo os autores adicionaram mais quatro características: VII) desregulação energética celular; VIII) evasão ao sistema imune; IX) mutação e instabilidade genética; X) indução de inflamação pelo tumor (Hanahan, Weinberg, 2011).

Devido a grande heterogeneidade tumoral, da imensa quantidade de tipos de tumor e dos vários possíveis mecanismos de resistência a quimioterapia, estratégias terapêuticas baseadas em um único tipo de tratamento ou droga não se mostraram ser bem sucedidas. De fato, tem se buscado entender as peculiaridades relativas a cada tumor e aí sim traçar estratégias para combatê-lo. A seguir, discutiremos em especial 2 tipos particulares de tumores: gliomas e melanomas.

1.4.1 Gliomas

Gliomas são as formas mais comuns e mais agressivos de tumor primário cerebral em adultos. Gliomas compreendem os glioblastomas [Grau IV dado pela Organização Mundial de Saúde (OMS)], astrocitomas anaplásticos (OMS de Grau III), oligoastrocitomas anaplásticos (OMS de Grau III) e oligodendrogliomas anapláticos (OMS de Grau III), sendo que o diagnóstico é feito a partir de biópsia do tumor (Stupp et al., 2010). Prognóstico é altamente dependente do grau do tumor. Assim, glioblastomas possuem o pior prognóstico, enquanto que oligodendrogliomas tende a responder melhor ao tratamento.

A incidência de gliomas é de aproximadamente 5 casos para cada 100.000 habitantes e esse tumor pode desenvolver em todas as idades sendo que é mais comum em pacientes a partir de 45 anos de idade e pode se localizar em um ou ambos lobos cerebrais (Stupp et al., 2010). Os pacientes frequentemente apresentam sintomas como dor de cabeça, náusea, episódios epiléticos e/ou mudança de personalidade (Omuro, 2013). A nível macroscópico, gliomas foram nomeados multiformes devido a grande variedade de tipos e tamanhos celulares que foram observados durante exame histológico. Examinado no microscópio gliomas são caracterizados por células tumorais invasivas (infiltrando-se no tecido cerebral), núcleos hipercromáticos, proliferação vascular e elevados níveis de necrose (Louis et al., 2007)

Terapia de pacientes recém diagnosticados com glioma frequentemente inicia-se com remoção cirúrgica da maior parte da massa tumoral. O objetivo com a cirurgia é obtenção de máxima ressecção tumoral com mínimo de impacto da função neurológica, assim estudos mostram que a extensão da ressecção do tumor tem correlação com o aumento da sobrevida de pacientes com glioma (Wolbers, 2014). Posteriormente a cirurgia, os pacientes com glioma são submetidos ao tratamento com radioterapia, sendo que a radioterapia focal fracionada (60 Gy, fracionada em 30 a 33 doses de 1.8 Gy) é o tratamento padrão. A quimioterapia é feita de forma concomitante ao tratamento radioterápico. O principal quimioterápico utilizado atualmente é o TMZ que é administrado por via oral numa dose de 75 mg/m² algumas horas antes do tratamento radioterápico (Stupp et al., 2010). Após o término do ciclo radio/quimioterapia, TMZ é administrado por 6 ciclos adicionais de 150 mg/m² por 5 dias a cada 28 dias (Stupp et al., 2005).

Além de TMZ, nitrosuréias cloroetilantes (CNU), como ACNU e BCNU bem como cisplatina, são utilizados para o tratamento de gliomas. Entretanto, esses protocolos clínicos apresentam sucesso limitado, e pacientes diagnosticados com glioma têm um prognóstico sombrio. De fato, a sobrevida média não passa de 15 meses e a taxa de sobrevida após 5 anos é de aproximadamente 2% (Wen, Kesari, 2008). Diversos mecanismos celulares de

resistência aos quimioterápicos têm sido descritos em gliomas. Certamente, a enzima O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) configura-se como um dos principais fatores que conferem resistência a esses quimioterápicos devido ao fato de que tanto os danos de DNA provocados por TMZ quanto ACNU e BCNU são reparados pela MGMT (Beier et al., 2011; Johannessen, Bjerkvig, 2012). Mas a quimiorresistência em gliomas está longe de se resumir a presença ou não de MGMT e outros fatores como status de p53, expressão de enzimas de reparo, processos de ativação e detoxificação têm também papel central na resistência a drogas antitumorais em gliomas (Sarkaria et al., 2008).

1.4.2 Melanomas

Melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele e sua incidência tem crescido significativamente durante as últimas décadas, com incidência mundial entre 15 a 60 casos para cada 100.000 habitantes (Garbe, Leiter, 2009), responsável por mais de 75% das mortes causadas por câncer de pele (Siegel et al., 2013). O alto índice de mortalidade associado ao melanoma é devido a sua natureza extremamente agressiva e a propensão a metástase (Schadendorf et al., 2015). Melanoma quando diagnosticado precocemente é curável cirurgicamente, entretanto, uma vez ocorrido a dispersão regional ou sistêmica do tumor as opções de tratamento são limitadas e geralmente consideradas ineficazes (Rubin, 2013). Assim, o diagnóstico precoce é vital para o prognóstico do paciente, uma vez que no estágio inicial a taxa de sobrevivência após 5 anos é em torno de 95% (Siegel et al., 2013). Entretanto, caso o melanoma tenha se espalhado para os órgãos vizinhos essa taxa cai para 65% e caso haja metástase para linfonodos a taxa de sobrevivência cai drasticamente, chegando a menos de 10% (Siegel et al., 2013). A cascata metastática em melanoma envolve processos complexos onde as células tumorais desligam-se do tumor primário, migram e invadem tecidos vizinhos. Eventualmente essas células podem cair na corrente sanguínea ou linfática, e em seguida extravasar em outros tecidos e estabelecer focos metastáticos em órgãos ou tecidos distantes (Fonkem et al., 2012). Melanoma é um tumor altamente agressivo e metastático sendo que em análises de autópsias de pacientes acometidos com melanoma, em 75% dos pacientes havia disseminação do tumor para o cérebro, fígado ou pulmões (Agarwala et al., 2014; Patel et al., 1978). Uma vez detectada metástase cerebral, pacientes com melanoma sobrevivem em média 4 meses (Fonkem et al., 2012) e a taxa de cura de pacientes com melanoma avançados é de menos de 1% (Perlis, Herlyn, 2004).

As formas de tratamento incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia,

assemelham-se assim ao método terapêutico utilizado para pacientes com glioma. Melanoma cutâneo tem uma taxa de cura bastante alta e em geral o tratamento resume-se a ressecção cirúrgica (Schadendorf et al., 2015). Já para os casos em que há metástase o tratamento é feito com quimioterapia e radioterapia.

O sucesso da quimioterapia em pacientes com melanoma metastático varia consideravelmente, dependendo principalmente da localização do tumor, assim, pacientes com focos metastáticos próximos a pele têm melhores chances de sobreviver do que aqueles com metástase em outros sítios anatômicos como cérebro (Gogas et al., 2007).

Tratamento quimioterápico com um único agente produz uma taxa de respostas em torno de 20%. Historicamente, dacarbazina (DTIC, primeira linha de tratamento) tem produzido taxas de resposta em torno de 15 a 25 % dos casos quando utilizado como agente único, com uma duração média de resposta em torno de 5 a 6 meses, sendo que em menos 5% dos casos há resposta completa (Gogas et al., 2007). O acompanhamento por longos períodos de pacientes tratados com DTIC sozinho mostrou que menos de 2% dos pacientes sobreviveram após 6 anos do início do tratamento. Entretanto, em estudos clínicos de fase III que usaram como critério a resposta ao tratamento, a taxa de sucesso do DTIC como agente único foi em torno de 12% (Middleton et al., 2000).

DTIC é um agente alquilante que é inativo quando administrado ao paciente, mas sofre ativação no fígado via o metabolismo oxidativo gerando o metiltriazeno carboxiamida imidazol (MTIC). DTIC tem como vantagem ser relativamente barato, facilidade de administração e é bem tolerado ao paciente. Entretanto, essa droga causa sim efeitos colaterais como neutropenia, trombocitopenia, náusea e vômito.

Outras drogas têm sido testadas em melanoma metastático para melhorar a resposta dos pacientes ao tratamento. A droga mais bem sucedida é o TMZ. Esse quimioterápico é uma pró-droga que é espontaneamente ativada no pH fisiológico gerando MTIC. Essa ativação espontânea é uma grande vantagem do TMZ, uma vez que a droga não precisa de ativação hepática pode ser tomada oralmente.

Testes clínicos de fase III mostrou que o tratamento de melanoma metastáticos com TMZ é tão eficaz quanto DTIC, com o aumento da sobrevida média do paciente de 1.9 versus 1.5 meses do DTIC (Middleton et al., 2000). Em outro estudo randomizado de fase III em que o tratamento com DTIC foi comparado com TMZ em 856 pacientes com melanoma metastático acabou confirmando os mesmos achados anteriores com uma sobrevida média de 2.3 meses com a administração de TMZ versus 2.17 meses com o tratamento com DTIC (Patel et al., 2011). Além disso, TMZ possui vantagens consideráveis

em relação a DTIC, uma vez que o TMZ é capaz de passar a barreira hematoencefálica, o que é imprescindível para pacientes com melanoma metastático cerebral. Além disso, TMZ é melhor tolerado e tem maior impacto positivo em termos da qualidade de vida do paciente em relação ao DTIC.

Como vimos tanto glioma quanto melanoma têm um prognóstico extremamente ruim. Dessa forma, o desenvolvimento de novas abordagens quimioterápicas para o tratamento mais eficaz contra gliomas e melanomas faz-se necessário. Uma alternativa interessante muitas vezes utilizada na clínica é a combinação de diferentes quimioterápicos visando potencializar o efeito terapêutico das drogas. O que se busca com essa estratégia terapêutica é que o efeito citotóxico das drogas juntas seja maior do que a somatória do efeito gerado pelas drogas separadas (efeito sinérgico). Assim, pode-se administrar doses menores e obter os mesmos ou melhores efeitos terapêuticos e, ao mesmo tempo, diminuir efeitos colaterais muitas vezes associadas aos quimioterápicos.

2 OBJETIVOS

Essa Tese de doutorado possui 2 objetivos principais:

- 1)** Explorar os mecanismos de resistência a cisplatina em células de glioma humano, em especial o status de p53, mecanismos de reparo de DNA e processos de detoxificação celulares de drogas antitumorais;
- 2)** Analisar o papel do fator de transcrição NFR2 na regulação da expressão e utilização da glutathione e explorar a relação da glutathione com a resistência a temozolamida em células de glioma e melanoma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Tabela 1: Lista das linhagens celulares empregadas neste projeto

Linhagem Celular	Status de p53	Descrição	Referências
U87 MG	Selvagem	Glioblastoma multiforme	(Clark et al., 2010)
U343 MG	Selvagem	Glioblastoma multiforme	(Westermarck et al., 1973)
U138 MG	Mutado	Glioblastoma multiforme	(Ishii et al., 1999)
U251 MG	Mutado	Glioblastoma multiforme	(Pontén, Macintyre, 1968)
B 16	Selvagem	Melanoma de camundongo C57BL/6J	(Briles, Kornfeld, 1978)
SKMEL 28	Mutado	Melanoma humano	
SKMEL 94	Mutado	Melanoma humano	
SKMEL 137	Selvagem	Melanoma humano	
HEK 293 T	Selvagem	Célula de rim embrionário humano	(Lin et al., 2014)

As células de glioblastomas, fibroblastos, embrionárias de rim e os melanomas humanos foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium* – LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), já as células de melanoma de camundongo foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os meios foram suplementados com 10% soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico (estreptomicina e anfotericina B, Life Technologies), em atmosfera de CO₂ (5%) em estufa aquecida a 37 °C em atmosfera úmida.

3.2 Cultivo celular

As culturas celulares eram mantidas em garrafas ou placas de poliestireno e os repiques eram realizados 2 vezes por semana. Os repiques se davam quando as células atingiam 80 a 90% de confluência. Para tanto, primeiramente as células eram lavadas com tampão fosfato salino PBS (Phosphate buffer saline – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM NaHPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH = 7,6) e em seguida era adicionado tripsina para a digestão da matriz proteica responsável pela aderência celular. Após o descolamento das células da placa de cultura a reação de digestão foi interrompida com a adição de meio de cultura com 10% SFB. De forma geral, uma proporção 1:5 ou 1:7 da cultura celular, a depender da capacidade de replicação de cada linhagem, era então subcultivada.

Para o processo de congelamento, as células eram tripsinizadas em seguida ressuspendidas em meio com 10% SFB e adicionadas 10% de DMSO (dimetilsulfóxido - Merck, Darmstad, Alemanha). Aproximadamente, 1×10^6 células em volume de 1,5 mL eram transferidas para ampolas de congelamento e colocadas rapidamente em recipiente de congelamento *Cryo 1 °C freezing container* (Nalgene, Drive Rochester, NY, EUA) contendo isopropanol e deixadas no congelador -80 °C por 24 h para o congelamento gradual. Em seguida, as células eram transferidas para um galão contendo nitrogênio líquido.

3.3 Drogas e tratamentos

Cisplatina: (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Diluída em PBS numa concentração estoque de 1 mM, e para a completa solubilização a droga era incubada a 50 °C por 30 min. Devido a ativação da droga pelo processo de aquação, novas diluições eram realizadas a cada vez que a droga era utilizada, não havendo assim o armazenamento da droga em solução. As células eram tratadas com doses crescentes da droga que era mantida por 1 h e depois trocado o meio de cultura para os experimentos de detecção imunológica (*slot blot*) e imunofluorescência e para os outros experimentos a droga era mantida durante todo o tempo no meio de cultura.

Ezatiostat: (Sigma-Aldrich). Inibidor da enzima glutatationa-S-transferase P1-1 (GSTP1-1). Diluído em DMSO em concentração estoque 5 mg/mL. Aliquotas de 200 µL em tubos eppendorf foram mantidas a -20 °C. Células foram tratadas com 5 µm/mL por 16 h e após esse período foram co-tratadas com TMZ que eram mantidas durante todo o experimento.

L-Buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO): (Sigma-Aldrich). Inibidor específico de γ -glutamylcisteína sintetase, enzima chave na biossíntese de glutatationa. Diluído em PBS numa concentração estoque de 1 mM. A droga em solução não era estocada e, assim, a cada tratamento novas soluções eram feitas. As células eram pré-tratadas com 10 a 100 µM de BSO por 16 h e então co-tratadas com cisplatina e/ou TMZ, que eram mantidas por toda a duração do experimento.

N-acetil L-cisteína (NAC): (Sigma-Aldrich). Precursor da glutatationa. Diluído em meio de cultura numa concentração estoque de 25 mM e a cada experimento novas soluções eram feitas. As células eram pré-tratadas com 1 ou 2,5 mM de NAC por 16 h e depois tratadas em conjunto ou não com cisplatina e/ou TMZ que eram mantidas por todo o período do experimento.

Temozolomida (TMZ): (Sigma-Aldrich). Diluída em DMSO numa concentração estoque de 50 mM. Aliquotas de 1 mL em tubos eppendorf eram mantidas a -20°C . A droga era adicionada ao meio de cultura, em diferentes concentrações, e mantidas durante todo o tempo do experimento.

3.4 Silenciamento gênico utilizando esiRNA

O silenciamento gênico foi efetuado utilizando a tecnologia de RNA de interferência. Foi utilizado o sistema esiRNA (Sigma-Aldrich) que contém um conjunto de moléculas de RNA dupla fita com sequências complementares a diferentes alvos do RNA mensageiro cuja tradução se quer silenciar. Os esiRNA de interesse foram ressuspensos em água livre de RNAase numa concentração estoque de $20\ \mu\text{M}$ e mantidos a -20°C . Foram plaqueadas 7×10^5 células em placa de 100 mm de diâmetro e 24 h depois as células foram transfectadas com esiRNA ($10\ \text{nM}$) utilizando oligofectamina ($5\ \mu\text{L}$) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em $500\ \mu\text{L}$ de meio sem soro. Esse processo foi repetido mais uma vez no dia seguinte, havendo portanto, uma dupla transfecção do esiRNA. No dia seguinte, as células foram plaqueadas para os diversos experimentos. Para confirmação do silenciamento do gene de interesse, 48 h depois da primeira transfecção as células foram coletadas para análise da expressão proteica por *Western blot*.

3.5 Viabilidade celular através de método colorimétrico – XTT

Foi utilizado o reagente Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche, Basel, Suécia) nos experimentos de viabilidade celular. O princípio da técnica baseia-se na medida colorimétrica da redução do sal de tetrazólio (incolor) em sal solúvel formazan (alaranjado), sendo que essa reação é dependente da atividade mitocondrial celular. Para tanto, cerca de 1×10^5 células de diferentes linhagens foram plaqueadas em placas de 12 poços em duplicata. No dia seguinte, foram tratadas com doses crescentes de quimioterápicos e outras drogas. Após 72 ou 120 h de tratamento, as placas foram lavadas com PBS e acrescentou-se a mistura formada pelo agente acoplador de elétrons e o sal de tetrazólio, na proporção de 1:50, por aproximadamente 1 h. O sobrenadante, então, foi recolhido e a leitura da absorbância foi feita nos comprimentos de onda de 492 e 750 nm. O valor obtido a 492 nm foi subtraído do obtido a 750 nm, e com esses valores calculou-se a porcentagem de sobrevivência celular, tendo como referência a amostra não tratada.

3.6 Análise de fragmentação de DNA (população sub-G1) e ciclo celular

O ensaio de sub-G1, indicativo de morte celular por processo apoptótico, foi realizado por citometria de fluxo pela análise da fragmentação do DNA de células marcadas com iodeto de propídeo (PI). Para tanto, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro em duplicata e no dia seguinte foram tratadas com diversas drogas em diferentes concentrações. A análise se dava 3 ou 5 dias após o tratamento a depender da droga utilizada. Foram coletadas as células tanto aderidas quanto em suspensão em tubos de 15 mL. Seguiu-se a centrifugação a 1500 rpm por 2 min e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado resultante foi fixado com 1 mL de etanol 70% e mantido a -20°C por pelo menos 2 h. No dia do ensaio, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS e o precipitado foi ressuscitado em 200 μL de solução de PI (20 $\mu\text{g/mL}$ de PI, 200 $\mu\text{g/mL}$ de RNAase, 0,1% triton X-100, diluídos em PBS) e incubado por 20 min a temperatura ambiente. O PI é um fluoróforo capaz de intercalar com o DNA, assim é possível fazer-se a correlação da fluorescência emitida pelo PI com a quantidade de DNA presente na célula. Para leitura da fluorescência foi utilizado o citômetro Guava EasyCyte Plus System (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA). A análise perfil do ciclo celular bem como a análise da população em sub-G1 do foi realizada pelo software Cytosoft 5.3 (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA).

3.7 Detecção de γH2AX ou Caspase 3 ativada por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 1×10^5 células em placas 35 mm de diâmetro em duplicata e no dia seguinte as células foram tratadas com diferentes drogas e coletadas em diversos tempos após tratamentos. Para a imunodetecção de γH2AX e Caspase 3 ativada, células foram fixadas com 1 mL de 1% de formaldeído (diluído em PBS) e incubadas por 15 min em gelo. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com etanol 70% por pelo menos 2 h a -20°C . Seguiu-se então o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos através da incubação com 500 μL de solução de BSA-T-PBS (Bovine Serum Albumin – 1% BSA, 0,2% triton X-100 em PBS) por 5 min a temperatura ambiente. As células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuscitado em 50 μL do anticorpo mouse anti- γH2AX Ser 139 (Upstate, Merck Millipore) diluído 1:500 ou FITC Rabbit anti-Active caspase-3 (BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, EUA) diluído 1:50 e incubado por durante a noite a 4°C sob agitação. No ensaio para detecção de γH2AX , as células foram então incubadas com anticorpo secundário (anti-mouse

FITC, Sigma-Aldrich) diluído 1:200 e incubadas por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. As células foram marcadas com PI como descrito anteriormente e submetidas a citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com o software Cytosoft 5.3.

3.8 Detecção de adutos de cisplatina e γ H2AX por imunofluorescência

Foram plaqueadas 3×10^5 células em crescimento exponencial, em placas de 35 mm de diâmetro contendo previamente uma lamínula de 13 mm de diâmetro. No dia seguinte, foram tratadas com 50 μ M de cisplatina por 3 h. As células foram fixadas com 500 μ L de paraformaldeído por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS e incubadas com 500 μ L de solução de bloqueio (2% de BSA, 0,3% Triton-X100 em PBS) e incubadas durante a noite com anticorpo primário mouse anti- γ H2AX (Upstate) diluído 1:1000 ou anticorpo primário *rat* anti-cisplatina [CP9/19] (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluído 1:5000. Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 50 μ L de anticorpo secundário *anti-mouse* Alexa Fluor 546 (1:2000; Molecular Probes, Thermo Fisher) ou de *anti-rat* FITC (1:2000; Sigma-Aldrich) por 2 h no escuro. Após lavagens com PBS foi adicionado o marcador nuclear DAPI e as células foram montadas em laminas histológicas e analisadas em microscopia de fluorescência Axiovert 200 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com software Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss).

3.9 Western Blot

Células foram coletadas e os precipitados celulares foram estocados a -80 °C até o procedimento de extração proteica. Para isso, o precipitado celular foi ressuspensionado com solução de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 1% triton X-100; 0,1% SDS), juntamente com inibidor de protease (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) numa proporção de 1:500 e DNAase incubado em gelo por 20 min. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 min a 14000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C. A quantificação proteica se deu utilizando o Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). Para curva proteica padrão foi utilizada solução de BSA em concentrações que variavam de 0,05 mg/mL a 5 mg/mL. A leitura da densidade óptica foi realizada no Glowmax-Multi+ Luminometer (Promega, Fitchburg, WI, EUA) no comprimento de onda de 595 nm.

Após quantificação proteica, 5 µL de tampão de carregamento (50 mM Tris/HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 1% β-Mercaptoetanol) era adicionada cada amostra e estas eram incubadas a 100 °C por 5 min para desnaturação proteica. A depender da proteína de interesse, diferentes concentrações proteicas (30 µg a 80 µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% (acrilamida 12%/bisacrilamida 0,2%; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8; SDS 1%; APS 1% e 0,5/mL µL Temed). Após separação das proteínas por eletroforese, deu-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana, então, foi incubada com solução de bloqueio (5% leite desnatado em PBS e 0,1% Tween-20) por 1 h a temperatura ambiente sob agitação e depois, incubadas com os seguintes anticorpos primários anti-p53 1:1000; anti-NRF2 1:200; anti-GAPDH 1:2000; anti-tubulina 1:2000; anti-laminina 1:1000; anti-p21 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), SLC3A1/CTR1 (Abcam, Cambridge, MA, EUA) durante a noite a 4 °C sob agitação. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com 0,2% Tween em PBS e depois incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse* HRP 1:1000 ou *anti-rabbit* HRP 1:1000 (a depender do anticorpo utilizado) por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o *Luminata Forte Western HRP substrate* (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) e a detecção da quimioluminescência foi feita utilizando-se o fotodocumentador (ImageQuant 300, GE Healthcare, Cleveland, OH, EUA). A quantificação das bandas foi feita utilizando o software Image J.

3.10 PCR em tempo real (RT-PCR)

Foram plaqueadas 2×10^4 células em placas de 35 mm de diâmetro e coletadas em 6 ou 24 h após tratamento com 300 µM de TMZ. Seguiu-se então a extração de RNA utilizando o *PureLink RNA Mini kit* (Life Technologies) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com DNase para eliminação de possível DNA contaminante. Para isso, 2 µg de RNA foram tratados com 2 µL de DNase (*DNase Treatment of RNA Samples Prior to RT-PCR*, Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL de tampão e H₂O para quantidade suficiente para 10 µL final e incubados a 37 °C por 30 min. Então, foi realizada a síntese de cDNA (DNA complementar) utilizando o *High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) nas seguintes condições: 2 µL de *Random Primers*, 1 µL de transcriptase reversa, 0,8 µL de dNTP mix, 2 µL de tampão e 4,2 µL de H₂O livre de RNase. A reação

foi realizado no termociclador utilizando o seguinte programa: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 s.

Em seguida, as amostras foram diluídas 1:5 com H₂O livre de RNase e foi adicionado 3 µL da amostra por poço em triplicata na placa de 96 poços acrescido de 0,5 µL de primer (forward + reverse numa concentração de 10 µM cada), 6 µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), e 2,5 µL H₂O livre de RNase. A reação foi realizada no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Como gene referência foram usados o gene da β-actina ou GAPDH, a depender da linhagem celular utilizada.

3.11 Quantificação dos níveis de glutathiona intracelular

Foram plaqueadas 3×10^5 células em placas de 35 mm de diâmetro em triplicata e no dia seguinte foram tratadas com BSO (1 a 1000 µM) ou NAC (2,5 mM) por 16 h. Após esse período, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio acrescido de 10% SFB e centrifugadas a 1500 rpm por 10 min a 4 °C. Então, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em solução de ácido metafosfórico 5% diluído em PBS e incubadas em gelo por 30 min. O conteúdo de glutathiona foi analisado utilizando HPLC (*High performance Liquid Chromatography*) acoplado com sistema de detecção eletroquímico (ESA Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EUA). O equipamento é composto de 584 bombas, detector 5600 A CoulArray e detector UV-Vis SPD-10AV VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) e foi utilizada uma coluna Kinetix C18 100 x 2.1 mm, 2,6 µM (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) mantida a temperatura de 28 °C. Cada corrida foi realizada sob fluxo isocrático ($0.4 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$) por 10 min. Os dados foram coletados com o detector UV no comprimento de onda 215 nm e com o detector eletroquímico no comprimento de onda 400, 600 e 950 mV

Foi também utilizado o GSH-Glo GSH Assay Kit (Promega) para a medida da concentração intracelular de glutathiona. Para tanto, 2×10^3 células foram plaqueadas em placas opacas de 96 poços em triplicata e no dia seguinte, células foram incubadas com BSO (1 a 1000 µM) ou NAC (2,5 mM) por 16 h. Passado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas 100 µL de solução contendo luciferina modificada (Luc-NT) e glutathiona S-transferase (GST) por 30 min a temperatura ambiente. Depois, foi adicionada 100 µL da enzima luciferase e seguiu-se incubação por mais 15 min a temperatura ambiente. A luminescência foi medida usando o Glomax-Multi+ Luminometer (Promega). O princípio desse ensaio, baseia-se no fato de que a substrato da luciferase, a

luciferina, somente estará disponível se houver a conversão da Luc-NT em luciferina pela reação da GST que por sua vez está condicionada a disponibilidade de glutathione (Figura 3). Desta forma, quanto mais glutathione houver na célula mais luminescência essa célula irá emitir.

Figura 3. Representação esquemática do método de quantificação de glutathione intracelular utilizando o GSH-Glo GSH Assay Kit (Adaptada do manual do GSH-Glo GSH Assay Kit (Promega)).

Em ambos os métodos, para fazer a conversão das medidas obtidas em concentração, diluições seriadas de glutathione foram utilizadas para gerar uma curva padrão. E as amostras foram normalizadas pela concentração proteica referente a cada poço pelo método de Pierce BCA Protein Assay kit como descrito anteriormente.

3.12 Quantificação de dano no DNA pela metodologia do PCR longo

Essa técnica foi desenvolvida pelo grupo do Prof. Ben van Houten (Santos et al., 2006) e o Dr. Leonardo Lima estabeleceu essa metodologia em nosso laboratório. Esse ensaio baseia-se no fato de que determinados danos de DNA são capazes de bloquear a atividade da DNA polimerase. Assim, após tratamento das células com algum agente que produza lesões que param a DNA polimerase é realizada a extração do DNA genômico e é amplificada uma região relativamente grande de um determinado gene (10 a 14 kbp) para aumentar a sensibilidade da técnica. E o produto final da PCR é em função da quantidade de danos no DNA.

Foram plaqueadas 3×10^5 células em placas de 100 mm de diâmetro 24 h antes do tratamento com 100 μM BSO. Após 16 h, foram tratadas com 50 μM de cisplatina e incubadas por mais 3 h. Em seguida, o DNA genômico foi extraído com o DNAeasy Blood and Tissue kit (Quiagen, Valencia, CA, EUA), quantificado com o Quant-iT picogreen

dsDNA kit (Invitrogen) e as amostras foram diluídas para uma concentração final de 3ng/μL. Os primers utilizados para a reação de PCR foram os seguintes 5'-TGGAAACCCTGTGGGCGGATAATA-3' and 5'-CTCCAGGCCTAAGGAGCAGCAGAA-3'. Para a cada reação de PCR foi utilizado: 5 μL DNA (3ng/μL); 4,4 μL de tampão TaKaRa LA PCR com Mg; 6,6 μL dNTP; 0,4 μL primer (Forward + Reverse 10 μM cada) e 9,6 μL de H₂O milli-Q. As amostras foram então para o termociclador a 85 °C por 5 min a fim de obter o chamado *hot start* e assim diminuir a formação de *primer dimers*. Passados os primeiros 3 min de incubação foi adicionada a polimerase: 0,36 μL TaKaRa LA PCR polymerase (Takara Bio Inc., Mountain View, CA, USA) e 14,64 μL de H₂O milli-Q. Em seguida as amostras foram submetidas as seguintes condições:

- 1) 94 °C por 3 min
- 2) 30 vezes: 94 °C por 30 s
69 °C por 9 min

Terminada a reação de PCR, parte do produto da PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8 % (0,8 g de agarose, 100 mL de TBE 1x e 4,5 μL de brometo de etídio por 30 min a 100 V para visualização da banda. Outra parte do produto da PCR foi quantificado com Quant-iT picogreen dsDNA kit. Para isso, 10 μL de produto da PCR em placa opaca de 96 poços e adicionado 90 μL de TE e 100 μL de *picogreen* diluído 1:200 em TE). Para análise de quantidade de danos no DNA os valores de fluorescência obtidos das amostras tratadas são divididos pela amostra controle (não tratada). Em seguida, para determinar a frequência de lesões foram estimadas baseando-se na distribuição de Poisson.

3.13 Obtenção de bactérias eletrocompetentes

Amostras da cepa de *Escherichia coli* DH10B foram plaqueadas em meio LB sólido (10 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl e 7,5 g/L ágar) sem antibiótico e incubadas na estufa a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, uma colônia isolada foi inoculada em 2 mL de meio LB líquido (sem adição de ágar) incubado a temperatura de 37 °C e frequência de rotação de 220 rpm. Na manhã seguinte, foi adicionado 1 mL do pré-inóculo à 200 mL de meio LB líquido, mantidos nas mesmas condições do pré-inóculo até que fosse atingido uma densidade ótica (D.O) entre 0,4 - 0,6. O conteúdo do inóculo foi distribuído em 4 tubos falcons de 50 mL, previamente mantidos imersos em gelo, e colocados no gelo por 15 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000

rpm a 4 °C por 15 min. Logo em seguida, foi descartado o sobrenadante, os tubos foram colocados novamente no gelo, e o precipitado bacteriano foi ressuspensionado com 50 mL água milli-Q estéril gelada. Repetiu-se o processo de centrifugação nas mesmas condições, descartou-se o sobrenadante e o precipitado agora foi ressuspensionado com 25 mL água milli-Q estéril gelada. Seguiu-se a centrifugação, e o precipitado resultante foi ressuspensionado com 10 mL glicerol 10% estéril gelado. Após nova centrifugação da amostra o precipitado foi finalmente ressuspensionado em 1 mL glicerol 10% estéril gelado que foi distribuído em alíquotas de 50 µL e estocado a -80°C.

3.14 Transformação de *E. coli* por eletroporação

À uma alíquota de bactéria eletrocompetente (50 µL) foi adicionado 1 µL do plasmídeo de interesse. O conteúdo do microtubo foi transferido para uma cubeta, previamente imersa em gelo e foi procedido o eletrochoque com os seguintes parâmetros: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Imediatamente após o choque foi adicionado em cada tubo 450 µL meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 100 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose, pH 7,4) e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h, sob agitação. Decorrido o tempo de incubação necessário para que as bactérias se recuperem do choque elétrico, 100 µL da amostra incubada foi plaqueada em meio LB-ágar (LB acrescido de 1,5% de ágar) contendo antibiótico indicado para a seleção bacteriana e a placa então foi incubada durante a noite à 37 °C.

No dia seguinte, colônias bacterianas foram crescidas em 2 mL de meio LB líquido com antibiótico adequado para seleção e incubadas a 220 rpm a 37 °C durante a noite. Depois a cultura líquida foi centrifugada a 14000 rpm a temperatura ambiente por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TE (10 mM tris e 0,1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (200 µg/mL). Adicionou-se 200 µL de solução de lise (100 µL 0,4M NaOH e 100 µL SDS 2%) e após 5 min à temperatura ambiente foi adicionado 150 µL de 3 M acetato de sódio pH 4,5, seguiu-se a centrifugação a 14000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Então, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foi adicionado 1 mL de isopropanol e procedeu-se centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado lavado com 600 µL de etanol 70% e as amostras foram submetidas a centrifugação a 14000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Novamente o sobrenadante foi descartado e os tubos foram

invertidos sob papel absorvente e deixados à temperatura ambiente até secar completamente. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de TE contendo RNase e estocado a -20 °C.

3.15 Clonagem da Luciferase e Renilla no vetor pShuttle

Os fragmentos gênicos do gene repórter Luciferase (*luc*) e da Renilla (*RL*) foram obtidos após digestão, com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Xba* I, dos plasmídeos comerciais pGL4 e pRL (Promega), respectivamente. A seguir, *luc* ou *RL* foram inseridos no vetor de expressão de células de mamíferos pShuttle, gerando o vetor pShuttle/Luc ou pShuttle/RL (Soltys et al., 2013). Ambos plasmídeos, separadamente, foram utilizados na transformação da cepa eletrocompetente DH10B de *E. coli*. Os clones bacterianos contendo o pShuttle/Luc ou pShuttle/RL foram semeados durante a noite em meio LB contendo 50 µg/mL kanamicina, seguido de extração plasmidial por mini-prep. O DNA plasmidial extraído de cada colônia foi então digerido com as enzimas *Nhe* I e *Xba* I e submetido a análise em gel de agarose 1% (1 g de agarose, 100 mL de TBE 1x e 4,5 µL de brometo de etídio) e verificado se houve a liberação de fragmento de tamanho aproximadamente 2 Kbp ou 1 Kbp (tamanhos dos cDNAs dos genes Luciferase e Renilla, respectivamente). Em seguida, um clone de pShuttle/Luc ou pShuttle/RL foi escolhido para subsequente preparo em larga escala por maxi-prep (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante.

3.16 Ensaio de HCR (*Host Cell Reactivation*)

Para indução de danos no DNA plasmidial, o vetor pShuttle/Luc foi tratado com doses crescentes de cisplatina ou ACNU. Assim, o plasmídeo pShuttle/Luc (concentração de 500 ng/µL) num volume de 200 µL eram tratados com diferentes concentrações de cisplatina ou ACNU por 4 h a 37 °C. Após esse período, o DNA plasmidial foi precipitado utilizando 0,1 volume de NaOAc 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 100%, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 600 µL de etanol 70% e centrifugado por mais 5 min nas mesmas condições anteriormente mencionadas. Após o descarte do sobrenadante o tubo foi deixado aberto a temperatura ambiente para eliminar o etanol residual e o DNA plasmidial foi ressuspensionado em TE.

Para o ensaio de HCR, foram plaqueadas 1×10^4 células em placas opacas de 96 poços em triplicata. No dia seguinte, para cada ponto, um total de 200 ng de plasmídeos (180 ng pShuttle/Luc e 20 ng pShuttle/RL) foram usados na transfeção celular que foi feita

utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen) na proporção de 1:3 (1 µg de DNA para 3 µL de Lipofectamine 2000). Dois dias após a transfecção, empregamos o kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega) para medir a atividade dos genes repórteres. Esse sistema permite a leitura dos dois genes repórteres no mesmo ensaio: Luciferase, do pShuttle-Luc; e Renilla, do pShuttle-RL. Este último plasmídeo funciona como um controle de transfecção utilizado para a normalização, o que auxilia na interpretação dos dados uma vez que minimiza diferenças relacionadas à eficácia da transfecção e número de células (McNabb et al., 2005). A leitura da atividade de luciferase foi realizada utilizando-se luminômetro Glomax-Multi+ Luminometer (Promega). A luminescência detectada pelo luminômetro foi gerada pela ação da Luciferase ou Renilla sobre seus respectivos substratos (luciferina ou coelenterazina) sendo que cada um dos produtos dos genes repórteres emitem luz em comprimento de onda diferentes e, assim, são facilmente distinguíveis (**Figura 4**).

Figura 4. Reações de bioluminescência catalisadas pelas luciferases de Firefly e Renilla. (Adaptada do manual do *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega)).

3.17 Clonagem do gene repórter Luciferase em vetor lentiviral

Através da digestão do plasmídeo pShuttle/Luc com a enzima *Xho* I, o fragmento gênico da Luciferase de Firefly foi liberado. Este gene foi, então, clonado no vetor lentiviral pLV-CMV-SV40-Puro, gentilmente cedido pela Professora Silvy Stuchi Maria Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Após reação de ligação, os plasmídeos lentivirais foram transformados por eletroporação em cepas DH10B de *E coli*, selecionados com 50 µg/mL ampicilina e após mini-prep, foram submetidos à digestão com a enzima *Xho* I. Seguiu-se a análise por gel de agarose 1% e verificação se havia a liberação de fragmento correspondente ao tamanho do gene da luciferase. Um clone

positivo (que continha *luc* inserido no pLV-CMV-SV40-Puro) foi preparado em larga escala, por Maxi-prep (Qiagen) segundo as especificações do fabricante. O plasmídeo lentiviral recombinante obtido foi chamado pLV/Luc.

3.18 Obtenção de linhagens celulares que expressem luciferase (silenciamento por shRNA)

Para obtenção de linhagens celulares que expressem construtivamente o gene repórter Luciferase, foi realizado a produção de lentivírus recombinantes. Para isso, 2×10^6 células HEK 293T foram plaqueadas em placa de 100 mm de diâmetro em triplicata. E no dia seguinte, foram co-transfectadas com os vetores pLV/Luc e três plasmídeos auxiliares: 1) pRRE (empacotamento); 2) pREV (direcionamento do exportação citoplasmática do RNA); 3) pVGVS (envelope) (**Figura 5**).

Figura 5. Sistema de plasmídeos para a produção lentiviral. 1) Vetor de transferência contendo o promotor CMV seguido do sinal de empacotamento (Ψ), RRE (elemento de ligação ao *rev* para exportação citoplasmática do RNA), o cassete de expressão do transgene contendo promotor interno e o gene de interesse, e 3'LTR. Todos os genes que codificam proteínas estruturais ou enzimas foram removidos do HIV-1 original. Juntamente com o vetor de transferência (1), o plasmídeo de empacotamento (2), o plasmídeo de expressão do *rev* (3), e o plasmídeo do envelope (4) são necessários para a produção do vetor lentiviral.

Três dias depois da transfecção o sobrenadante é transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugados a 19400 rpm por 2 h a 4 °C. Após esse processo o sobrenadante é desprezado e é adicionado 200 μ L de DMEM sem soro e sem antibiótico e incubado a 4 °C durante a noite. 4×10^3 células previamente plaqueadas são incubadas por 4 h com 100 μ L do vírus de interesse acrescido de 300 μ L DMEM sem soro e sem antibiótico. Após esse período é adicionado 400 μ L de meio com 20% SFB e 2% de antibiótico.

Seguiu-se então seleção das células transduzidas através da adição de puromicina (0,7 µg/mL) ao meio de cultura celular. A cada dois dias havia a troca do meio de cultura com adição de puromicina até a completa seleção das células transduzidas, isso se dava em torno de 10 a 14 dias em cultura. Uma vez selecionadas as linhagens foram testadas para avaliar a expressão da Luciferase utilizando o Dual-Glo luciferase kit (Promega). No caso das linhagens transduzidas com shRNA, foi realizado ensaios de RT-PCR e *Western blot* para validação da redução da expressão dos genes de interesse.

3.19 Slot-Blot

2×10^4 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro e incubadas por 24 h nas condições de cultura celular previamente citadas. As células então foram tratadas com 50 µM de cisplatina por 1 h e depois o meio era sugado e substituído por meio de cultura sem a droga. Foram recolhidas amostras após 0, 24 e 48 h após a incubação com cisplatina. Após extração do DNA genômico com o DNAeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) as amostras foram quantificadas por NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, 190 µL de 2 M acetato de sódio foi adicionado à 1 µg de DNA genômico (100 ng/µL). As amostras foram incubadas a 100°C por 10 min para desnaturação do DNA. Um total de 500 ng por poço de DNA genômico, foi aplicado numa membrana de nitrocelulose (Bio-rad Trans-Blot). A membrana então foi incubada em forno de hibridização, a 80 °C por 2 h e depois bloqueada em solução de bloqueio (5 g de leite desnatado diluído em 100 mL de PBS) por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário 1:5000 anti-cisplatin [CP9/19] (Abcam) durante a noite a 4 °C sob agitação. No dia seguinte, deu-se a incubação com anticorpo secundário 1:200 anti-mouse HRP (BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, EUA) por 2 h à temperatura ambiente sob agitação. Após 3 lavagem com PBS, a membrana foi incubada com 1 mL de Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore) e a detecção da quimioluminescência foi feita utilizando-se o fotodocumentador (ImageQuant 300, GE Healthcare, Cleveland, OH, EUA). A quantificação das bandas foi feita utilizando o programa Image J.

3.20 Ensaios *in vivo*

Os animais *nude* foram obtidos com grupo Prof. José Belizário do Departamento de Farmacologia/ICB, USP e também do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Foram também realizados experimentos com camundongos C57BL/6J obtidos do biotério do Departamento de Microbiologia ICB, USP.

Nos experimentos com modelo xenográfico de glioma humano, foram utilizados animais *nude* fêmeas com idade entre 10 a 12 semanas. Cerca de 2×10^6 células tumorais U87Luc ou U138Luc foram implantadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos *nude*. Já nos camundongos C57BL/6J foram inoculadas células da linhagem B16 que são células de melanoma de camundongo C57BL/6J. Nesse caso, foram inoculadas 2×10^5 células B16Luc.

O peso e o tamanho do tumor eram medidos 3 vezes por semana, sendo que a medida do volume tumoral era feita através do uso de paquímetro e o cálculo do volume do tumor se dava de acordo com o seguinte fórmula:

$$\text{Volume tumoral} = (\text{comprimento}^2 \times \text{largura})/2$$

Nos experimentos em que foram utilizados animais *nude*, uma vez o tumor tendo alcançado o volume 100 mm^3 , o que levou em torno de 3 semanas, iniciou-se o tratamento. Os animais foram divididos em 8 grupos ($n=5$ por grupo): 1) PBS; 2) BSO (450 mg/kg); 3) Cisplatina (1 mg/kg); 4) TMZ (10 mg/kg); 5) TMZ + cisplatina; 6) BSO + cisplatina; 7) BSO + TMZ; e 8) BSO + cisplatina + TMZ. Todas as drogas foram injetadas por via intraperitoneal, num volume de $100 \mu\text{L}$. Sendo que o BSO foi injetado 5 h antes do tratamento com cisplatina e/ou TMZ. O tratamento se deu no seguinte regime: 3 dias consecutivos e depois 1 vez por semana por 2 semanas. Após 21 dias do início do tratamento os animais foram submetidos a imageamento intravital utilizando o IVIS Spectrum System (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA).

Para o experimento com animais C57BL/6J, 5 dias após a inoculação das células tumorais já foi possível detectar a presença de tumor, assim, realizamos as medidas do volume tumoral com auxílio de paquímetro e quando o volume tumoral atingiu aproximadamente 100 mm^3 (no 7º dia após a inoculação das células tumorais) iniciamos o tratamento com os quimioterápicos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) PBS; 2) BSO (450 mg/kg); 3) TMZ (30 mg/kg) e 4) TMZ + BSO, sendo que cada grupo era constituído por pelo menos 5 animais. As drogas foram injetadas por via intraperitoneal, num volume final de $200 \mu\text{L}$. Realizamos o seguinte regime de tratamento: 3 dias consecutivos, seguidos por 2 dias de intervalo e mais 2 dias consecutivos de tratamento. No último dia de

tratamento os animais foram sacrificados, utilizando câmara de CO₂. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICB, USP.

3.21 Imageamento de bioluminescência *in vitro* e *in vivo*

A progressão tumoral foi avaliada através da expressão do gene repórter Luciferase utilizando imageamento de bioluminescência *in vivo*. Nesse tipo de técnica, os fótons produzidos nas reações de bioluminescência são capturados por câmeras ultrasensíveis CCD (*charge coupled device*) e são usados para criar uma imagem representativa da intensidade de luz (Prescher, Contag, 2010). Células tumorais U87Luc ou U138Luc que expressam Luciferase, foram plaqueadas ou inoculadas nos animais e, após tratamento, foram feitas imagens em intervalos de tempo determinados. Uma vez que a Luciferase se propaga com a divisão celular, a intensidade e a distribuição espacial do sinal da luminescência correlacionam com o número de células e sua localização. Nos experimentos *in vitro*, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 12 poços e no dia seguinte foram tratadas com BSO (100 μ M) por 16 h. Então, as células foram tratadas com cisplatina (1 μ M) e/ou TMZ (10 μ M). 120 h depois, o meio de cultura foi sugado e foi adicionado em cada poço 1 mL de meio DMEM com 10% SFB e 1% antibiótico contendo D-luciferina (150 μ g/ml) e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Para ensaios *in vivo*, foi inoculado por via intraperitoneal 100 μ L de D-luciferina (150 mg/Kg) para medida do tamanho do tumoral e 100 μ L Z-DEVD-aminoluciferin (50 mg/kg) para detecção de células em apoptose. Os animais eram então, anestesiados com isoflurano e mantido sob sedação durante todo o curso do experimento. Após 10 min da inoculação dos substratos da Luciferase os animais ou, no caso de experimentos *in vitro*, a placa de cultivo celular foram alocados no IVIS Spectrum System (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) para obtenção das imagens de bioluminescência. O IVIS está alocado no CEFAP (Centro de Facilidades e Apoio a Pesquisa) do ICB, USP.

3.22 Ensaio Cometa

Para detecção de quebras no DNA genômico após tratamento com TMZ, foram plaqueadas 10^5 células U138MG em placas de 35 mm. No dia seguinte, as células foram tratadas com 100 μ M de BSO por 16 h e em seguida foi adicionado 300 μ M de TMZ por 2 h. As amostras foram então tripsinizadas, ressuspensas em 180 μ L de 0,5% agarose *low*

melting mantidas a 37 °C e espalhadas homoganeamente em lâminas de microscopia previamente cobertas com 1,5% de agarose mantidas a temperatura ambiente. Em seguida, para solidificar a agarose *low melting* as lâminas foram mantidas a 4 °C por 10 min. Após esse período as amostras foram mantidas durante a noite a 4° C em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO em pH 10,0). As lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 min com tampão neutro (300 mM CH₃COONa, 100 mM Tris, pH 8,5) e as amostras foram colocadas horizontalmente na cuba de eletroforese (imersa em gelo) contendo tampão neutro por 1 h antes de serem submetidas a eletroforese a 14 V e 12 mA por 1 h. Subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas através da lavagem com tampão de neutralização (0.4 M Tris, pH 7.5) 3 vezes por 5 min cada. Em seguida as amostras foram fixadas com etanol 100% gelado por 30 min a 4 °C. Finalmente, as amostras foram coradas com brometo de etídeo e as imagens foram obtidas utilizando microscopia de fluorescência (Axiovert 200, Zeiss) com objetiva de 400x.

3.23 Quantificação de tiól total reduzido

O conteúdo total de tióis foi determinado pela detecção da redução de DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)]. Em placas de 96 foi adicionado 50 µl de DTNB (3 mM) em PBS e 100 µl das amostras de extrato total celular (10 µg) em PBS. A liberação do ânion 5-tiolbenzoato foi detectado utilizando espectrofotômetro com leitura a 412 nm. A quantificação dos tióis foi realizada utilizando a seguinte fórmula: $C = A/\epsilon$ (onde, C = concentração; A = absorbância; ϵ = o coeficiente de extinção da glutathiona [13600 M/cm]) e foi expressa em mM de DTNB reduzido por miligrama de proteína.

3.24 Quantificação de ROS

No ensaio para medida de ROS intracelular foi utilizada a sonda fluorescente DCFDA. Para tanto, 3×10^5 células foram plaqueadas e após tratamento com TMZ (300 µM), e peróxido de hidrogênio (100 µM) foram incubadas com 10 µM de DCFDA por 30 min. Após esse período, as células foram coletadas e submetidas a análise por citometria de fluxo.

CAPÍTULO 2

4 EXPLORANDO OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À CISPLATINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO

4.1 Cisplatina

Passadas pouco mais de 4 décadas da aprovação da agência reguladora americana FDA (*Food and Drug Administration*) do uso para tratamento de câncer de testículo, cisplatina continua como uma dos agentes antitumorais mais utilizados e eficazes. De fato, em combinação com bleomicina e etoposídeo, o tratamento com cisplatina levou a taxas de cura acima de 95% dos casos de câncer de testículo (Kartalou, Essigmann, 2001).

Além do extraordinário sucesso em câncer de testículo, cisplatina é usada como primeira linha de tratamento para uma grande espectro de tumores sólidos como câncer de ovário, pulmão e testículo (Kelland, 2007; Siddik, 2003). E essa droga é também usada como terapia adjuvante em combinação com outros quimioterápicos no tratamento de vários outros tipos de câncer como carcinoma cervical e também no tratamento de gliomas recorrentes (Keys et al., 1999; Silvani et al., 2004; van den Bent et al., 2006). Entretanto, é um consenso na comunidade científica e médica que o calcanhar de Aquiles do tratamento com cisplatina é a resistência tumoral a essa droga (Kartalou, Essigmann, 2001).

Cisplatina é uma molécula pequena e bastante simples composta de um átomo de platina ligada a 2 amidas e 2 átomos de cloro. Mas apesar de seu tamanho é uma droga muito poderosa. O efeito citotóxico da cisplatina é primariamente devido ao dano no DNA genômico. Essa droga em ambiente de baixa concentração de cloro, como as condições encontradas no citosol celular, sofre um processo conhecido como aquação, no qual ocorre a substituição de 1 ou 2 cloros por moléculas de H₂O. Pelo processo de aquação a cisplatina torna-se altamente reativa e rapidamente liga-se a uma variedade de biomoléculas dentro da célula (Siddik, 2003). Certamente, a reação da droga com o DNA é a interação mais danosa e configura como o principal mecanismo na qual a cisplatina induz a morte celular (Wang, Lippard, 2005).

Na sua forma reativa, cisplatina covalentemente liga-se a bases do DNA formando adutos. A droga reage especialmente com sítios nucleofílicos de sítios N7 de purinas (guaninas e adeninas) formando ligações cruzadas nas fitas do DNA. Quando em contato com DNA a cisplatina ativada liga-se covalentemente a purinas, formando ligações cruzadas

1,2 ou 1,3 intracadeias e ligações cruzadas intercadeia (**Figura 6**). A ligação da cisplatina com o DNA se dá especialmente com a guanina na posição N7, de tal forma que 65% dos adutos de cisplatina são formados entre duas guaninas adjacentes e 25% dos átomos de platina estão ligados a uma guanina e uma adenina. Entre 3-5% dos adutos são formados entre duas fitas de DNA, lesão que é conhecida como ligações cruzadas intercadeia ou ICL (Wang, Lippard, 2005). Os adutos cisplatina-DNA geram deformações da dupla hélice, que provocam: inibição da replicação, inibição da transcrição, levando ao bloqueio do ciclo celular e a indução de apoptose (Galluzzi et al., 2012). Ou seja, o principal mecanismo de indução de morte por cisplatina é dano no DNA.

Figura 6: Principais lesões no DNA causadas por cisplatina. A) Aduto de cisplatina do tipo 1,2 GG intracadeia; B) aduto de cisplatina do tipo 1,3 GG ou 1,3 GA intracadeia; C) Lesão do tipo ligação cruzada intercadeia (ICL).

Apesar de ser um quimioterápico muito eficaz existem dois grandes problemas relacionados com essa droga. O primeiro são os efeitos colaterais que podem ser bastante severos e incluem nefrotoxicidade, perda de audição e náuseas (Rajeswaran et al., 2008). O segundo grande problema é que apesar da sua eficiência, resistência a cisplatina, seja ela intrínseca ou adquirida durante ciclos de terapia, é relativamente comum e superar a resistência continua sendo o principal desafio da terapia de cisplatina como agente

antitumoral. Diversas são as maneiras que as células contam para impedir que cisplatina entre em contato com o seu DNA. Por exemplo, as células podem diminuir a entrada da droga, através da redução de canais transportadores de cobre (CTR1, do Inglês *Copper Transporter 1*); podem aumentar a saída da droga, através da indução da expressão de bombas de efluxo; ou podem ampliar processos de detoxificação celular, através do aumento da concentração de GSH e metaloproteínas (Byun et al., 2005). Entretanto, uma vez que a cisplatina alcance e interaja com o DNA, para que a célula possa resistir ela tem que ser capaz de remover ou tolerar a lesão, caso contrário o dano causado pela cisplatina induzirá massivamente apoptose (Wang, Lippard, 2005). Assim, um outro importante mecanismo de resistência que as células podem utilizar para minimizar os efeitos tóxicos da cisplatina é pelo aumento da capacidade de reparo (maior expressão de genes da via de NER ou da via de reparo de ICL), ou mesmo pelo aumento da tolerância dos danos (maior expressão de genes da via de TLS). Os principais mecanismos de resistência celular à cisplatina estão melhor detalhados a seguir.

4.2 Mecanismos de resistência à cisplatina

4.2.1 O papel dos canais transportadores de cobre

Por ser uma molécula polar, cisplatina não atravessa facilmente a membrana plasmática celular de forma passiva. Na verdade, para entrar na célula a droga geralmente se utiliza de canais proteicos transmembranares, como os canais transportadores de cobre (CTR1 do Inglês, *Copper Transport Channel*). Uma vez que é necessária a entrada da droga para que ela exerça sua ação citotóxica, muitos estudos mostram que há uma forte correlação entre expressão de CTR1 com resistência a cisplatina (Hall et al., 2008).

Para ilustrar alguns desses trabalhos, foi demonstrado que camundongos *Ctrl knockout* havia redução no acúmulo de cisplatina nas células desses animais (Ishida et al., 2002), bem como foi mostrado que em linhagens de tumores de ovário resistentes a cisplatina havia menor expressão de CTR1, o que garantia a essas células menor aporte da droga, quando comparado com as linhagens sensíveis (Zisowsky et al., 2007). E num estudo com pacientes com câncer de pulmão foi observado que pacientes cujos tumores superexpressavam *Ctrl* responderam melhor ao tratamento com cisplatina e tiveram aumento significativo na sobrevida após tratamento (Chen et al., 2012).

4.2.2 O papel da glutatona

GSH é o mais abundante antioxidante e o principal agente detoxificante que as células dispõem. GSH é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, sendo que as suas propriedades como antioxidantes e de conjugação é devido a sulfidril contida no seu resíduo de cisteína (Zhang, Forman, 2012). Assim, GSH pode diretamente reagir com radical superóxido, óxido nítrico ou radical hidroxila (Singh et al., 1996) ou, de maneira enzimática, pode agir como doador de elétrons para a glutathione peroxidase (GPx) na redução de peróxido de hidrogênio (Chance et al., 1979). Enquanto que a manutenção da homeostase redox é essencial para proteção contra danos oxidativos, GSH está também intimamente envolvido no processo de detoxificação de numerosos agentes xenobióticos. Para tanto, a família das enzimas glutathione-S-transferases (GST) utilizam o GSH como co-fator na reação de conjugação com diferentes agentes estranhos à célula como por exemplo quimioterápicos, resultando na formação do complexo GSH-droga que é agora exportado para fora da célula através de bombas de efluxo como as canais associadas à resistência a multidroga (Laborde, 2010).

A síntese de GSH se dá por dois processos enzimáticos: o primeiro ocorre por ligação de um resíduo de glutamato à cisteína catalisada pela glutathione cisteine ligase (GCL), que é um heterodímero composto pela subunidade catalítica (GCLC) e pela subunidade modulatória (GCLM); em seguida se dá a adição da glicina através da ação enzimática da glutathione sintetase (GS). O produto final da oxidação de GSH é a glutathione dissulfeto (GSSG), sendo que GSH pode ser restaurado a partir de GSSG através da enzima glutathione redutase (GR). Importante notar que durante a ação da GPx ou GR a quantidade total de GSH no meio intracelular não muda, o que é alterado é a relação GSH/GSSG. Entretanto, a ação catalisada pela GST diminui os níveis de GSH intracelular, uma vez que essa enzima exporta GSH conjugado com alguma molécula (Townsend, Tew, 2003). Nos casos em que há diminuição dos níveis de GSH as células necessitam sintetizar GSH *de novo*. Para tanto, ocorre a indução da expressão tanto de GCL quanto GS pelo fator de transcrição fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2, do Inglês *factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). De fato, NRF2 é o principal indutor da expressão de enzimas envolvidas na produção, utilização e exportação de GSH (Gorrini et al., 2013).

É bem descrito que a GSH pode ligar-se covalentemente à cisplatina. Esse é um mecanismo importante de detoxificação da droga uma vez que a ligação à GSH previne que a cisplatina se ligue ao DNA, seu principal alvo terapêutico (Chen, Kuo, 2010a). De fato, a correlação entre resistência à cisplatina mediada pela superexpressão de GSH foi

confirmado em várias linhagens celulares, como carcinoma de bexiga e laringe (Rabik and Dolan 2007).

Células de tumores de ovário resistentes obtidas através da exposição de doses crescentes de cisplatina mostraram ser até 1000 vezes mais resistentes a cisplatina e tinham os níveis de GSH aumentados em até 30 vezes quando comparado com as células não resistentes que lhe deram origem (Godwin et al., 1992).

4.2.3 O papel do reparo de DNA

NER é o principal mecanismo de reparo responsável por lidar com as lesões mais frequentes causadas por cisplatina, ou seja, os adutos 1,2 GpG ou 1,3 ApG (ligações cruzadas intracadeia) de cisplatina. Esse mecanismo de reparo é composto por duas subvias: reparo do genoma global (GGR, do Inglês *Global Genome Repair*) que reconhece e repara lesões por todo o genoma; e reparo acoplado a transcrição (TCR, do Inglês *Transcription Coupled Repair*) que lida com lesões em genes ativamente transcritos. As proteínas da via de NER primeiramente reconhecem a lesão, que na subvia de GGR é realizado pelo heterodímero XPC-HR23B e caso do TCR o reconhecimento se dá pelo bloqueio da elongação da RNA polimerase em associação com as proteínas CSA e CSB. Os passos subsequentes são compartilhados pelo TCR e GGR, estes envolvem a abertura da dupla fita de DNA por helicases específicas (XPB e XPD) seguida da clivagem da fita contendo a lesão por endonucleases (ERCC1/XPF cliva na porção 5' e XPG age na porção 3' em relação a lesão). Finalmente, o oligonucleotídeo (em torno de 30 nucleotídeos de extensão) contendo a lesão é excisado e a lacuna resultante é preenchida pela DNA polimerase e usando a fita intacta como molde (Costa et al., 2003; Menck, Munford, 2014).

Considerando o fato que cisplatina causa dano no DNA não é surpreendente que células com processos de reparo mais eficientes tenham uma vantagem proliferativa sobre as outras células que tenham dificuldades em lidar com lesões de cisplatina. Assim, foi demonstrado, em linhagens de câncer de ovário, que o aumento de ERCC1 estava associado à resistência à cisplatina (Parker et al., 1991). A alta expressão de ERCC1 também foi associada com o pior prognóstico em pacientes portadores de câncer de esôfago tratados com quimioterapia (Reed, 2005). Alguns estudos demonstram ainda que os mecanismos de HR e NHEJ são também importantes para o reparo dos danos no DNA induzidos por esta droga. Por outro lado, a perda da atividade de reparo de bases emparelhadas erroneamente foi demonstrada como um mecanismo de resistência à cisplatina (Siddik, 2003).

Além dos adutos que são substrato para via de NER, cisplatina gera também lesões do tipo ICL. Esse tipo de lesão em que uma molécula de cisplatina liga-se a 2 bases presentes em fitas opostas do DNA é considerada uma lesão extremamente deletéria para a célula a ponto que a presença de algumas poucas lesões do tipo ICL sejam suficiente para levar a célula a morte (Osawa et al., 2011).

O reparo desse tipo de lesão é realizado por um conjunto substancial de proteínas de várias vias de reparo. O reconhecimento e remoção desse tipo particular de dano no DNA é mediado por múltiplos sistemas de reparo de DNA, principalmente pela via de Fanconi, NER, HR e TLS. Dessa forma, esses mecanismos são importantes na resistência a agentes que causam ICL como cisplatina e podem estar implicados no resultado do tratamento do câncer. Um grande corpo de evidências indica que as proteínas de NER também têm um papel importante na via de ICL. As proteínas XPD, XPF, XPG e ERCC1 estão entre as que participam da via de NER e estão envolvidas no reparo de ICL. Dessa forma, deficiência em um dessas proteínas pode, em princípio, levar a uma menor capacidade de reparar lesões no DNA provocadas por cisplatina o que por sua vez pode levar a indução mais pronunciada de morte celular. XPD por exemplo interage com proteína de recombinação homóloga Rad51 aumentando a eficiência de remoção de ICL (Aloyz et al., 2002).

4.2.4 O papel da síntese translesão

Aumento da tolerância ao dano é um mecanismo adicional usado pelas células para conferir resistência à cisplatina. A tolerância de lesões no DNA é realizada por enzimas da via de síntese translesão (TLS) que são polimerases especializadas que possuem sítios catalíticos maiores que possibilita a polimerização da fita de DNA mesmo que a fita molde contenha lesão, dessa forma, o dano continua no DNA genômico, mas a célula pode replicar seu material genético (Martin et al., 2008; Prakash et al., 2005).

Em humanos, várias polimerases estão envolvidas em TLS: polimerases da família Y (polimerase eta [Pol η], polimerase iota [Pol ι], polimerase kapa [Pol κ] e Rev1) e da família B polimerase zeta (Pol ζ). Cada uma dessas polimerases possuem diferentes afinidades por substratos, sendo que é frequente que um dano específico possa ser tolerado por mais de uma polimerase.

Estudos *in vitro*, utilizando DNA polimerases purificadas demonstraram que Pol η é a mais eficiente entre todas as polimerases TLS na tolerância de adutos GpG de cisplatina (Vaisman et al., 2000). Em um outro trabalho mais recente, TLS de aduto de cisplatina é

realizado por duas vias distintas: a inserção de 1 nucleotídeo na fita oposta ao dano é catalisada pela Pol η ou Pol κ e em seguida a extensão de alguns nucleotídeo após a lesão é feita pela Pol ζ . É importante notar que a atividade de Pol η resultou na replicação translesão de uma maneira livre de erros enquanto que Pol κ em combinação com Pol ζ levou a inserção de nucleotídeos mal pareados na frente de adutos GpG de cisplatina (Shachar et al., 2009).

Pol η é responsável pela TLS várias lesões que distorcem a dupla hélice do DNA. Pol η é codificada pelo gene *XPV* e sua deficiência resulta em humanos na síndrome Xeroderma Pigmentoso Variante (XPV), que é caracterizado pela extrema sensibilidade a radiação UV e pela alta incidência de câncer (Cordonnier, Fuchs, 1999). Assim, em conformidade com o fato dessa polimerase participar no *bypass* de adutos de cisplatina, linhagens celulares provenientes de pacientes XPV exibiam grande sensibilidade a cisplatina e esse fenótipo é revertido pela a complementação com Pol η selvagem (Albertella et al., 2005)(Lin et al., 2006).

4.2.5 O papel de p53

O principal objetivo do tratamento quimioterápico é causar morte massiva das células tumorais. Entre a enorme quantidade de proteínas envolvidas na resposta a danos no DNA certamente a proteína supressora de tumor p53 tem um papel decisivo e central. P53 é um fator transcricional que se liga a sítios específicos do DNA genômico ativando uma variedade enorme de genes (Oren, 2003). Os produtos desses genes participam diretamente na resposta aos danos no DNA causados pelas drogas, entre eles indução da parada de ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (Sax, El-Deiry, 2003).

Estabilização e ativação de p53 são críticos para modulação da morte celular após tratamento com agentes antitumorais. Em termos de resistência a cisplatina p53 age como uma faca de dois gumes. Por um lado, células tumorais deficientes em p53 podem ser resistentes a cisplatina pela não indução de apoptose dependente de p53 (Stewart, 2007). Por outro lado, deficiência em p53 pode diminuir o processo de DDR como indução de parada de ciclo e aumento da capacidade de reparo de DNA levando assim a sensibilização à cisplatina (Sax, El-Deiry, 2003; Zamble et al., 1998).

Um vasto número de estudos tem demonstrado diminuição da indução de apoptose por cisplatina em linhagens tumorais com p53 mutado (Fan et al., 1994; Perego et al., 1996; Reles et al., 2001). Entretanto, muitos são os estudos que mostram que ao contrário p53 mutado pode sensibilizar células tumorais ao tratamento com cisplatina (Fan et al., 1995;

Hawkins et al., 1996). Sendo que esse aumento da sensibilidade a cisplatina foi atribuído a impedimento da parada de ciclo celular mediado por p53, que limita o tempo para o reparo do DNA lesionado. Além disso, também foram feitas observações em casos clínicos em que pacientes com tumor foram responsivos ou não tratamento com cisplatina independente do status de p53 (Weller, 1998). Assim, muitos trabalhos apresentam dados conflitantes relacionando o status de p53 e resistência e, desta forma, ainda não está claro se p53 tem papel decisivo na determinação a resistência a cisplatina.

O destino das células contendo danos no DNA está diretamente relacionada com a severidade do insulto e a taxa de reparo dessas lesões, e é especialmente determinada pela duração e nível de ativação da sinalização de p53. Assim, quanto mais rápido a lesão no DNA for reparada, mais fracamente será a ativação de p53, prevenindo assim que as células entrem em apoptose.

Em trabalhos anteriores com células derivadas de glioblastomas, foram identificados processos de sinalização para apoptose, dependente de p53, induzidos por TMZ e agentes cloroetilnitrosouréias. Desta forma, após tratamento com agentes cloroetilantes como nimustina (ACNU) ou carmustina (BCNU), células humanas de glioma mutadas em p53 apresentam maior sensibilidade do que células selvagens em p53, provavelmente devido à ausência de reparo de adutos provocados por essas substâncias (Batista et al., 2007). Ao contrário, células tumorais selvagem em p53 são mais sensíveis ao tratamento com TMZ do que as células que apresentam uma versão mutada da proteína, muito provavelmente devido à indução da sinalização para morte celular (Roos et al., 2007).

Apesar dos grandes avanços a respeito do mecanismo de ação da cisplatina e fatores de resistência a essa droga, não está claro quais são os fatores determinantes que conferem resistência a cisplatina em células de glioma humano. Assim este trabalho tem como objetivo investigar os possíveis vias envolvidas na resistência a cisplatina nesse modelo tumoral.

4.3 Resultados

4.3.1 O status de p53 isoladamente não é suficiente para determinar sensibilidade a cisplatina em células de glioma

Trabalhos anteriores de membros de nosso laboratório demonstraram que p53 funcional pode ter efeitos opostos em células de glioma tratadas com TMZ e ACNU (Batista et al., 2007; Roos et al., 2007). A fim de estender essas observações de sensibilidade de células de glioma humanos a quimioterápicos, nós tratamos as células com cisplatina. Para tanto, utilizamos 4 linhagens de glioma humano com diferentes *status* funcional de p53: U87MG e U343MG com p53 selvagem (p53wt); U251MG e U138MG mutadas para p53 (p53mt). Todas as 4 linhagens foram incubadas com doses crescentes de cisplatina e após 120 h de tratamento, a viabilidade celular (medida pelo ensaio de XTT) e os níveis de apoptose (dados pela quantificação da população em sub-G1) foram avaliados. Utilizando o ensaio de XTT observamos que essas linhagens celulares U87MG, U343MG (p53 selvagem) e U251MG (p53 mutado) mostraram níveis de sensibilidade à cisplatina muito semelhante já a linhagem U138MG mostrou-se resistente a droga (**Figura 7A**). Em concordância com o resultado de viabilidade celular, a análise da população em sub-G1 (metodologia empregada para análise da fragmentação do DNA devido ao processo apoptótico), em células tratadas com cisplatina indicaram os menores níveis de células apoptóticas na linhagem U138MG entre as linhagens analisadas (**Figura 7B-C**). É importante notar que a linhagem U251MG que também possui p53 mutado mostrou ser altamente sensível a cisplatina como pode-se observar pela baixa porcentagem de células viáveis ou pela grande quantidade de células em apoptose (**Figura 7A-C**).

Figura 7. Sensibilidade celular frente ao tratamento com cisplatina. A) Curva dose resposta a cisplatina de 4 linhagens de glioma humano, avaliado pelo ensaio de XTT 72 h após o tratamento com doses crescentes de cisplatina; B) População das células de glioma em sub-G1 analisadas por citometria de fluxo 72 h após o tratamento com doses crescentes de cisplatina; C) Histogramas representativos de citometria de fluxo de células marcadas com PI. Os níveis de sub-G1 foram avaliados 72 h após o tratamento com cisplatina nas doses indicadas. Em A e B os experimentos foram realizados em triplicada (XTT) ou em duplicata (sub-G1) e os dados plotados nos gráficos representam a média de 3 experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Além disso, quando p53 foi silenciado em células U87MG (p53wt) ou na linhagem U138MG (p53mt) utilizando esiRNA (**Figura 8A**), não verificamos diferença na viabilidade celular frente ao tratamento com cisplatina (**Figura 8B**). Esses resultados indicam que a sensibilidade a cisplatina é independente do *status* funcional de p53 em células de glioma, e outros fatores de resistência devem ter papel mais decisivo em proteger células contra a indução a morte realizada por cisplatina.

Figura 8. Efeito do silenciamento de p53 em células de gliomas tratadas com cisplatina. A) Imagem representativa do silenciamento de p53 em células U87MG utilizando esip53 analisado por *Western blot*. **B)** Viabilidade celular analisada pelo ensaio de XTT das células U87MG e U138MG transfectadas com esiLuc ou esip53 e após 72 h de tratamento com cisplatina. Os experimentos foram realizados em triplicata (XTT) e os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (ns = não significativo).

4.3.2 Não há expressão diferencial do CTR1 entre as linhagens de glioma

Outro importante mecanismo de resistência a cisplatina que algumas células tumorais contam é a redução da expressão de canais de transporte de cobre, CTR1, que está envolvido na entrada de cisplatina na célula. Assim, a menor a expressão desse canal de transporte pode diminuir a quantidade de cisplatina intracelular podendo então ser o fator que determinasse a resistência das células U138MG. Entretanto, a análise de expressão proteica realizada pelo ensaio de *Western blot* revelou que não havia diferença nos níveis da proteína CTR1 em todas as 4 linhagens investigadas (**Figura 9**). Com esse resultado, podemos concluir que a resistência a cisplatina encontrada em uma das linhagens de glioma não se deve a uma expressão diferencial de canais de transporte de cobre.

Figura 9. Expressão basal de CTR1 em células de glioma. Extratos proteicos das 4 linhagens de glioma humanos foram analisadas por *Western blot* para verificação da expressão de CTR1.

4.3.3 Menor quantidade de quebras no DNA na linhagem resistente após tratamento com cisplatina

Lesões do tipo ICL originadas de adutos de cisplatina, se não reparadas, são convertidas durante a replicação do DNA em DSBs. Este tipo de lesão é potencialmente deletéria e podem desencadear intensa sinalização para apoptose celular. Fosforilação da histona H2AX (conhecido como γ H2AX) é induzida durante o processamento de ICL e é amplamente utilizado como um marcador de DSBs (Olive, Banáth, 2009). Essa modificação na histona é um processo muito importante uma vez que gera remodelamento na cromatina na região de DSB, para acesso da maquinaria de reparo de DNA (Cleaver, 2011).

Os resultados mostrados na **Figura 10** apontam uma menor porcentagem de células com marcação positivas para γ H2AX na linhagem resistente após 6 h ou 24 h do tratamento com 25 μ M de cisplatina (**Figura 10 A-B**). Mesmo em doses maiores de cisplatina (50 μ M) a linhagem U138MG exibe uma diferença substancial da porcentagem de células com fosforilação na histona H2AX em relação as outras 3 linhagens (**Figura 10C**), indicando que menor quantidade de danos no DNA foi gerada nas células U138MG submetidas ao tratamento com a droga.

A **B** **C**

Figura 10. Imunodeteção de γ H2AX após tratamento com cisplatina. A) Histogramas representativos de citometria de fluxo para detecção de células positivas para γ H2AX. Células foram expostas a 25 μ M de cisplatina por 1 h. As células foram coletadas e fixadas após 6 h ou 24 h e submetidas à análise por citometria de fluxo. A fluorescência de PI, indicativa da quantidade de DNA, está representada no eixo X e a fluorescência está representada no eixo Y, referente às células marcadas com anticorpo anti- γ H2AX. B) Quantificação da porcentagem de células positivas para γ H2AX tratadas com 25 μ M e analisadas 6 h ou 24 h após o tratamento. C) Quantificação da população de células marcadas positivamente para γ H2AX, 24 h após o tratamento com 25 μ M ou

50 μ M. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3.4 Menor quantidade de adutos de DNA na linhagem resistente após tratamento com cisplatina

Existe uma grande quantidade de evidências que indicam que os níveis de adutos de DNA induzidos por cisplatina estão diretamente correlacionado com a citotoxicidade desse quimioterápico (Hoebbers et al., 2006; Siddik, 2003; van de Vaart et al., 2000). Assim, níveis reduzidos de danos ao DNA aumenta a resistência celular. A fim de verificar se as linhagens de glioma submetidas à mesma concentração e tempo de exposição à cisplatina tinham quantidades equivalentes de adutos de cisplatina, realizamos ensaios para avaliar os níveis de indução de lesões no DNA provocados por cisplatina. Utilizando anticorpo monoclonal que reconhece especificamente adutos de platina ligada a DNA (Liedert et al., 2006), fizemos experimentos de imunofluorescência com células U87MG e U138MG tratadas por 1 h com 50 μ M de cisplatina. Então o meio de cultura foi substituído e as células foram cultivadas por mais 3 h ou 24 h. Pelas imagens da imunofluorescência fica claro que a linhagem U138MG apresentaram uma menor marcação com o anticorpo contra adutos de cisplatina, ou seja, essas células tinham menos lesões no DNA que as células da linhagem sensível U87MG (**Figura 11**).

Figura 11. Detecção de adutos de cisplatina por imunofluorescência. Células de glioma humano foram tratadas com cisplatina (50 μ M) por 1 h. E após 3 h ou 24 h foram verificados os níveis de adutos de cisplatina por imunofluorescência. O núcleo foi marcado com DAPI (azul) e os adutos de cisplatina foram marcados com anticorpo secundário Alexa 488 (verde).

4.3.5 Reparo de DNA não está envolvido na resistência de U138MG

Em outro trabalho com essas mesmas linhagens de gliomas humanos, foi verificado que as células desencadeiam uma resposta apoptótica frente a irradiação com UVC de forma

dependente do seu *status* funcional de p53 (Batista et al., 2009). Desta forma, assim como verificado após tratamento com agentes com ACNU ou irradiadas com UVC, gliomas mutados em p53 apresentam maior sensibilidade do que células selvagens em p53 (Batista et al, 2007; Roos et al, 2007). Nesses trabalhos foi verificado que a exposição desses dois agentes genotóxicos é capaz de induzir a expressão de genes da via de NER como *XPC* e *DDB2*, o que levanta a possibilidade de que a diferença de sensibilidade pode ser provavelmente devido à redução de reparo dos danos provocados por esses agentes, na ausência de p53. Assim, ensaios de HCR foram realizados para avaliar a capacidade de reparo de adutos de ACNU e fotoprodutos de UVC em células de glioma com p53 selvagem ou mutado. Os resultados indicam que as linhagens exibem diferentes capacidades de reparar as lesões, sendo que, de fato, as linhagens com p53 selvagem possuem a maior capacidade de reparo em relação as lesões provocadas por UVC e ACNU (**Figura 12A-B**). Assim, esse resultado corrobora com a hipótese de que as células de glioma com p53 mutado são mais sensíveis a ACNU e UV devido a uma menor capacidade de reparo das lesões no DNA.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, de que maior capacidade de reparo leva a menor sensibilidade a um agente genotóxico, foram realizados ensaios de HCR para verificar se a linhagem de glioma resistente a cisplatina U138MG conta com uma capacidade aumentada de reparar adutos de cisplatina. Para tanto, pShuttle/Luc tratados com doses crescentes de cisplatina (10 nM a 500 nM) foram transfectados nas quatro linhagens de glioma juntamente com o pShuttle/RL, como controle de transfecção. Após 48 h os níveis de luciferase foram avaliados e a capacidade de reparo foi calculada tendo como referência a amostra não tratada. Pode-se observar que as quatro linhagens analisadas apresentavam capacidade de reparo muito semelhante (**Figura 12C**). Foi também realizado ensaio de *slot blot*, em que é utilizado anticorpo contra aduto de cisplatina para detecção no DNA genômico. Nesse ensaio, foi observado que 48 h após o tratamento com cisplatina, ambas as linhagens celulares (U87MG e U138MG) foram capazes de reparar praticamente todos os adutos de cisplatina no DNA genômico. Assim, corroborando com os dados de HCR, os dados de *slot blot* indicam que não há diferença na capacidade de reparo nas linhagens U138MG e U87MG. Esses resultados implicam que diferença no reparo de lesões causadas por cisplatina não é um fator que explicaria a maior resistência de U138MG. Entretanto, e em concordância com os resultados da figura 11, os dados de *slot blot* também indicam uma menor indução de adutos de cisplatina em células U138MG em relação a células U87MG.

Figura 12. Capacidade de reparo de DNA em células de gliomas. (A-C) Ensaio de HCR nas 4 linhagens de gliomas humanos utilizando plasmídeos pShuttle/Luc tratados com doses crescentes de UV-C, ACNU ou cisplatina. A bioluminescência emitida pela reativação do gene repórter Luciferase foi medida 48 h após a transfecção dos plasmídeos lesionados; **D)** Ensaio de *slot blot* para detecção de adutos de cisplatina no DNA genômico de células tratadas com 50 μM por 1 h e coletadas após 24 h ou 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata (HCR) ou em duplicata (*slot blot*) e os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3.6 A linhagem U138MG possui maior quantidade de GSH

Os dados obtidos até então sugerem que a resistência ao tratamento com cisplatina observada na linhagem U138MG não pode ser atribuída ao *status* funcional de p53, maior expressão de CTR1 nem mesmo a uma maior capacidade de reparar as lesões no seu DNA.

Entretanto, essas células foram de alguma forma protegidas da cisplatina com a formação de uma menor quantidade de danos de DNA, quando comparadas com as outras 3 linhagens de glioma como observado na **Figura 10, 11 e 12**.

A maior capacidade de detoxificação da cisplatina pode também explicar a sensibilidade diferencial observada entre essas linhagens, uma vez que isso pode reduzir o efeito citotóxico da cisplatina. E o principal agente detoxificador que a célula conta para se defender contra agentes xenobióticos é a GSH. GSH promove a detoxificação da cisplatina ao se ligar covalentemente a droga prevenindo que ela reage com DNA, seu alvo terapêutico. Desta forma, uma possível explicação para o fenômeno de menor quantidade de aduto de cisplatina observado no DNA das células U138MG pode ser devido a uma maior concentração de GSH nessa linhagem.

A fim de testar essa hipótese, foi realizada a quantificação dos níveis intracelulares de GSH das 4 linhagens de glioma. De fato, os níveis de GSH intracelular em células U138MG são maiores do que nas outras linhagens investigadas (**Figura 13**).

Figura 13. Níveis de GSH em células de glioma. Quantificação da concentração de GSH intracelular basal nas 4 linhagens de glioma humano. A quantificação de GSH foi realizada como descrito na sessão Materiais e Métodos e os valores obtidos foram normalizados pela quantidade de proteína contida em cada amostra.

4.3.7 Depleção de GSH aumenta a sensibilidade à cisplatina na linhagem U138MG

A fim de investigar se os níveis de GSH tem papel importante na resistência à cisplatina em células de glioma, os níveis de GSH foram modulados utilizando: butionina sulfoximina (BSO) um conhecido inibidor de γ -glutamylcisteina sintetase, enzima essencial para a síntese de GSH; e N-acetil-cisteína (NAC) é um precursor de GSH, aumentando assim a produção de GSH nas células. Primeiramente, estabelecemos a dose de BSO capaz

de inibir consideravelmente os níveis de GSH, para tanto, a célula U138MG foi tratada com 1 μM a 500 μM de BSO e incubado por 16 h a 72 h. Como observado na **Figura 14A**, houve uma diminuição acentuada de GSH a partir da dose de 10 μM em 16 h, em tempos maiores (48 h e 72 h) os níveis de GSH tendem a normalizar somente ficando em níveis baixos quando tratamos as células com uma dose de BSO de 500 μM . Infelizmente, nessa dose o BSO mostrou-se tóxico para a célula (dados não mostrados). Assim, passamos a utilizar a dose de 100 μM para todos os experimentos, uma vez que esta não afeta a viabilidade celular e ainda é capaz de manter baixos os níveis de GSH. Testamos essa dose de BSO em todas as linhagens celulares e a quantificação da GSH mostra que o BSO diminuiu drasticamente os níveis de GSH em todas elas enquanto que a incubação com NAC (1 mM) foi capaz de elevar consideravelmente a disponibilidade de GSH dentro das células (**Figura 14B**).

Figura 14. Modulação dos níveis de GSH por BSO e NAC. **A)** Quantificação dos níveis intracelulares de GSH na linhagem U138MG tratadas com doses crescentes de BSO (1 μM a 1000 μM) em função do tempo (16 h a 72 h); **B)** Quantificação dos níveis de GSH nas linhagens U87MG, U343MG, U251MG e U138MG após 16 h de tratamento com NAC (1 mM) ou BSO (100 μM).

4.3.8 BSO potencializa a citotoxicidade da cisplatina

O próximo passo foi então investigar o papel de GSH na resistência à cisplatina. Para isso, células de gliomas foram incubadas com BSO (100 μM) ou NAC (1 mM) por 16 h e depois foram tratadas com doses crescentes de cisplatina. BSO ou NAC individualmente não provocaram mudanças na viabilidade celular bem como não aumentaram os níveis de sub-G1 (**Figura 15A-B**). Entretanto, foi observado que BSO em combinação com cisplatina sensibilizou todas as 4 linhagens e mais importante, o pré-tratamento com BSO foi capaz de abolir a resistência à cisplatina da célula U138MG (**Figura 15A**). Por outro lado, adição de

NAC, anteriormente à incubação com cisplatina, foi capaz de proteger as células contra morte celular induzida por cisplatina (**Figura 15A**). Além disso, a porcentagem da população em sub-G1 foi aumentada quando cisplatina foi combinada com BSO, enquanto que NAC e cisplatina manteve níveis equivalentes de sub-G1 aos observados no grupo não tratado (**Figura 15B**).

Figura 15. Sensibilidade celular frente ao tratamento com BSO ou NAC seguido de cisplatina. **A)** Viabilidade celular de glioma tratados com BSO (100 μ M) ou NAC (1 mM) por 16 h antes do tratamento com cisplatina (1 μ M). 72 h após o tratamento com cisplatina foi realizado o ensaio de XTT. **B)** Quantificação da população em sub-G1 em células submetidas as mesmas condições de descritas; os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3.9 BSO potencializa a citotoxicidade de cisplatina devido ao aumento de danos no DNA

Para explorar os mecanismos envolvidos na potencialização da indução de morte celular observado quando combinamos BSO e cisplatina, avaliamos os níveis de dano no DNA após tratamento. Análise de citometria de fluxo mostrou que BSO induziu mais que o dobro de células positivas para γ H2AX, que demonstra que há maiores níveis de dano no DNA após tratamento de cisplatina na presença de BSO (**Figura 16A**). Enquanto que no grupo NAC seguido de cisplatina houve uma diminuição substancial de DSB em relação ao tratamento somente com cisplatina (**Figura 16A**). A fim de avaliarmos se essa maior quantidade de danos era devido a um aumento no número de adutos de cisplatina, realizamos o ensaio de *slot blot* utilizando anticorpo primário anti-cisplatina. Como podemos notar na **Figura 16B**, as células em que a GSH foi depletada com adição de BSO, apresentam aumento na marcação do anticorpo contra adutos de cisplatina em relação à amostra tratada com cisplatina isoladamente.

Figura 16. Lesões no DNA induzido por cisplatina em combinação com BSO ou NAC. A) Análise de células marcadas positivamente para γ H2AX por citometria de fluxo, 24 h após tratamento com cisplatina (25 μ M) isoladamente ou em combinação com BSO (100 μ M) ou NAC (1 mM); B) Ensaio de *slot blot* utilizando anticorpo contra adutos de cisplatina das 4 linhagens de glioma tratadas com as mesmas concentrações e coletadas no mesmo tempo que descrito em (A).

Além disso, marcação com o anticorpo anti-cisplatina e anti- γ H2AX, detectado agora por imunofluorescência, foi maior nas amostras tratadas com BSO e cisplatina (**Figura 17 A-B**). Também empregando a metodologia do PCR longo quantitativo (Santos et al., 2006), foi observado que cisplatina combinada com BSO gerava menos produto de PCR, indicando uma maior quantidade de lesões no DNA (**Figura 17C**). De fato, a estimativa da frequência de lesões no DNA calculada pela distribuição de Poisson revelou que a combinação dessas duas drogas induziu aproximadamente 4 vezes mais danos que a soma dos danos gerados pelas drogas separadamente (**Figura 17D**). Desta forma, a depleção de GSH pela pré-incubação com BSO aumenta a quantidade de cisplatina que verdadeiramente chega ao núcleo da célula, lesando o DNA genômico. Assim, o efeito sinérgico observado entre BSO e cisplatina, se dá devido a uma maior disponibilidade de cisplatina intracelularmente, o que possibilita que maior quantidade da droga chegue ao núcleo e reaja com o DNA o que provoca maior quantidade de lesões desencadeando intensa indução de morte celular.

Figura 17. Lesões no DNA genômico após tratamento com cisplatina e BSO. A-B) Células de glioma humano resistentes à cisplatina (U138MG) foram pré-tratadas com BSO (100 μ M) 16 h antes de serem incubadas com cisplatina (50 μ M). 1 h após o tratamento com cisplatina as células foram fixadas e incubadas com anticorpo anti-cisplatina ou anti- γ H2AX. **C)** As células foram submetidas ao mesmo tratamento descrito em A-B, segue-se a extração de DNA genômico que serviu de molde

para o ensaio de PCR longo. **D)** Quantificação das lesões de DNA através da análise do produto de PCR, medido por *Picogreen*. 3 experimentos independentes foram realizados (**p<0,01; ***p<0,001).

4.3.10 Combinação de BSO, cisplatina e TMZ: efeito sinérgico in vitro

Como mencionado anteriormente, o agente metilante TMZ é o quimioterápico mais utilizado para o tratamento de pacientes com glioma. TMZ, assim como a cisplatina, tem como alvo principal a molécula de DNA. Os efeitos citotóxicos dessa droga são provocados pela transferência de um grupo metil para guanina. O reparo dessa lesão é feita diretamente pela enzima MGMT que remove o grupo metil e depois é degradada. Uma vez que a MGMT é inativada nesse processo o reparo das lesões provocadas por TMZ é dependente dos níveis iniciais que estão presentes na células e da taxa de síntese de MGMT. De interesse, cisplatina é capaz de diminuir a atividade e expressão de MGMT, promovendo a potencialização dos efeitos citotóxicos do TMZ (D'Atri et al., 2000). Por essa razão, TMZ e cisplatina são usados em combinação para o tratamento de glioma. Um estudo recente mostrou que a resistência de células de glioma a TMZ está associada também com a baixa produção de ROS. Nesse trabalho, a resistência de células U251MG à TMZ foi revertida com o tratamento com BSO enquanto que NAC previne a toxicidade causada pela droga (Oliva et al., 2011).

Nós também observamos que, em todas as linhagens testadas, BSO potencializa a citotoxicidade provocada por TMZ (**Figura 18A**). Também, como verificado para BSO e cisplatina, a combinação de BSO e TMZ aumentou significativamente a porcentagem de células marcadas positivamente para γ H2AX (**Figura 18B**). Em outras palavras, a diminuição dos níveis de GSH intracelulares potencializa o morte celular induzida por TMZ devido ao aumento do dano de DNA.

Figura 18. Sensibilidade celular frente ao tratamento com NAC, BSO e TMZ. **A)** Quantificação da população em sub-G1 de células de glioma tratadas com NAC (1 mM) ou BSO (100 μ M) 16 h antes de serem incubadas com TMZ (25 μ M). 72 h após o tratamento com TMZ, as células foram submetidas a análise por citometria de fluxo. **B)** As células U87MG e U138MG foram submetidas as mesmas condições descritas em (A) e em seguida foram fixadas e incubadas com anticorpo primário anti- γ H2AX. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Baseado no fato de que a linhagem U138MG era também resistente ao tratamento com TMZ (Roos et al., 2007), nós resolvemos investigar a toxicidade em células de glioma após tratamento com BSO, cisplatina e TMZ. A fim de melhor verificar o possível efeito sinérgico entre a combinação das drogas, a linhagem U138MG foi tratada com baixas doses de TMZ (10 μ M) e cisplatina (1 μ M), doses estas que alteram minimamente a viabilidade celular. Após 72 h do tratamento com drogas isoladamente ou em combinação, a sensibilidade celular foi determinada pelo ensaio de XTT. Como pode ser claramente observado, o regime de tratamento com BSO, cisplatina e TMZ substancialmente reduziu a viabilidade celular e foi capaz de aumentar significativamente os níveis de apoptose, enquanto que o pré-tratamento com NAC protegeu as células contra a toxicidade mediada por cisplatina e TMZ (**Figura 19A-B**). Assim, um efeito sinérgico foi produzido pela combinação BSO, cisplatina e TMZ em células de glioma.

Figura 19. Sensibilidade celular frente ao tratamento com NAC, BSO, cisplatina e TMZ. A) Viabilidade celular de linhagens de glioma tratadas com NAC (1 mM), BSO (100 µM) por 16 h antes da incubação com cisplatina (1 µM) e/ou TMZ (10 µM). O ensaio de XTT foi realizado 72 h após tratamento com os quimioterápicos. B) Medida por citometria de fluxo da população em sub-G1. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados representam a média de 3 experimentos independentes (**p<0,01; ***p<0,001).

4.3.11 Combinação de BSO, cisplatina e TMZ: efeito sinérgico *in vivo*

A fim de avaliarmos o potencial terapêutico e também a toxicidade *in vivo* da combinação entre BSO, cisplatina e TMZ, estabelecemos linhagens de glioma que expressam constitutivamente o gene repórter luciferase (U87MGLuc e U138MGLuc). Utilizando essas células tumorais marcadas com luciferase é possível o acompanhamento da progressão tumoral de maneira não invasiva, sem necessidade de sacrifício do animal através da utilização do equipamento IVIS Spectrum, que permite o imageamento de bioluminescência *in vitro* e *in vivo*. Após 72 horas de tratamento, as amostras foram incubadas por 10 min com luciferina (substrato da luciferase) e submetidas ao IVIS para detecção da bioluminescência gerada. Em testes *in vitro*, e em concordância com os resultados do XTT e sub-G1, o tratamento com BSO, cisplatina e TMZ foi capaz de provocar grande morte celular, detectada pela baixa emissão de bioluminescência pelas células U138MGLuc (**Figura 20A-B**). Já nas amostras previamente incubadas com NAC, a bioluminescência gerada foi comparável a da amostra controle, não tratada (**Figura 20A-B**).

Figura 20. Citotoxicidade após tratamento com NAC, BSO, cisplatina e TMZ. **A)** Imagem representativa de bioluminescência da linhagem U138MGLuc detectada três dias após tratamento com diferentes combinações de drogas. **B)** Quantificação da emissão de bioluminescência detectada pelo sistema IVIS spectrum (**p<0,001)

Em seguida, cerca de 2×10^6 de células das linhagens U138MGLuc foram inoculadas em camundongos *nude*. Após quatro semanas, período em que o tumor ainda era indetectável visualmente, foi injetada intraperitonealmente luciferina (15 mg/kg) e depois de 10 min os animais foram submetidos a imageamento utilizando o sistema IVIS. Conforme consta na **Figura 21**, não foi possível observar a atividade luciferase pelas células tumorais. Assim, mesmo 3 meses após a inoculação, não pudemos observar a formação de tumor nos animais *nude*, sendo que o mesmo resultado foi reportado anteriormente por outro grupo (Kim et al., 2010).

Figura 21. Dificuldades no estabelecimento de tumor em animais *Nude* inoculados com U138MGLuc. Imagem representativa de bioluminescência de camundongos *nude* inoculados com U138MGLuc. Os animais foram inoculados com 150 mg/kg luciferina, anestesiados com isofluorano e após 10 min foram colocados no IVIS spectrum para aquisição de imageamento de bioluminescência.

Desta forma, U87MGLuc foi utilizada para inocular o flanco de animais *nude*, fêmeas com idade entre 6 a 10 semanas. Após aproximadamente 4 semanas da inoculação foi detectado o estabelecimento do tumor de glioma xenográfico por imagem de bioluminescência *in vivo* (**Figura 22**). Uma vez o tumor ter alcançado o volume de aproximadamente 100 mm³, os animais foram divididos em 8 grupos (n=5): 1) PBS; 2) BSO (450 mg/Kg); 3) Cisplatina (1 mg/Kg); 4) TMZ (10 mg/Kg); 5) Cisplatina + TMZ; 6) Cisplatina + BSO; 7) TMZ + BSO; 8) Cisplatina + TMZ + BSO. Utilizamos o seguinte regime de tratamento: 1 dose diária por 3 dias e depois 1 dose por semana por duas semanas (como indicado nos Materiais e Métodos).

Figura 22. Estabelecimento de tumor em animais *Nude* inoculados com U87MGLuc. Imagem representativa de bioluminescência de camundongos *nude* inoculados com U87MGLuc. Os animais foram inoculados com 150 mg/kg luciferina, anestesiados com isofluorano e após 10 min foram colocados no IVIS spectrum para aquisição de imageamento de bioluminescência.

Primeiramente avaliamos se a combinação entre as drogas poderia causar graves efeitos colaterais. Vale salientar que já existem diversos testes clínicos utilizando BSO associado a outros quimioterápicos para tratamento de diversos tumores e as pesquisas mostram que o BSO não produz efeitos colaterais importantes (Calvert et al., 1998; Chen,

Kuo, 2010a; O'Dwyer et al., 1996). Nos ensaios *in vivo* utilizando o modelo murino, também não foram observados efeitos colaterais severos decorrente do tratamento com BSO sozinho ou em associação com cisplatina e/ou TMZ, uma vez que em nenhum dos grupos de tratamentos houve morte ou foram detectado sinais de apatia ou agressividade exacerbada. Além disso, o peso dos animais foi medido 3 vezes por semana até o fim do tratamento e verificou-se que não houve perda de peso corporal significativa em nenhum dos grupos (Figura 23).

Figura 23. Progressão do peso corporal dos camundongos submetidos ao tratamento com quimioterápicos. O peso corporal dos animais foi medido 3 vezes por semana até o final do experimento, com o auxílio de balança de precisão. A medida do peso em cada ponto foi normalizada pelo peso inicial de cada animal e foi plotado no gráfico a média do peso corporal de cada grupo.

Inicialmente, para diretamente examinar a habilidade de BSO, cisplatina e TMZ em conjunto induzirem apoptose *in vivo*, utilizamos o reagente Z-DEVD-aminoluciferina. Nesse reagente a luciferina está acoplada a um tetrapeptídeo que é reconhecido e clivado por caspase 3-7 ativada. Assim, as células apoptóticas clivam a Z-DEVD aminoluciferina liberando a luciferina que pode agora reagir com a luciferase e emitir luz. Em outras palavras, utilizando esse substrato modificado da luciferase é possível de maneira pouco invasiva visualizar *in vivo* células apoptóticas.

Assim, 3 dias depois do início do tratamento, os animais foram injetados com Z-DEVD-aminoluciferina e a bioluminescência emitida foi detectado pelo sistema IVIS. E 8 h depois, período em que Z-DEVD-aminoluciferina já foi degradada e não servindo mais como substrato para a luciferase contida no tumor, foi injetado luciferina convencional a fim de mensurarmos o tamanho tumoral. Desta forma, nós normalizamos os dados de

bioluminescência gerados pela injeção de Z-DEVD-aminoluciferina pelos dados obtidos após injeção da luciferina convencional. Como pudemos observar na **Figura 24**, o grupo que foi submetido ao tratamento com BSO, cisplatina e TMZ emitiu pelo menos 5 vezes mais luminescência quando comparado com o grupo controle (PBS). Então, os dados mostram que a combinação entre as 3 drogas foi capaz de induzir fortemente apoptose *in vivo*.

Figura 24. Efeito do tratamento da cisplatina, TMZ e BSO *in vivo*. A) Imagens representativas de bioluminescência de camundongos tratados com PBS ou cisplatina, TMZ e BSO após injeção de

luciferina ou Z-DEVD aminoluciferina. **B)** Quantificação de bioluminescência Z-DEVD normalizada pela bioluminescência emitida quando injetado luciferina.

Notavelmente, 3 semanas após o início do tratamento, uma grande inibição progressão do crescimento tumoral foi observado no grupo de animais que foi tratado com BSO em combinação seja com cisplatina ou em combinação com TMZ (**Figura 25A-C**). Entretanto, esse efeito foi muito mais pronunciado nos animais que foram tratados com a combinação entre BSO, cisplatina e TMZ. De fato, ao final do tratamento (21 dias após a injeção da primeira dose), o volume tumoral do grupo controle (animais tratados com PBS ou BSO isoladamente) aumentou aproximadamente 35 vezes em relação ao volume inicial (100 mm^3), enquanto que no grupo tratado com a combinação entre as 3 drogas a média dos volumes tumorais se manteve praticamente inalterada (**Figura 25B-C**).

A **B** **C**

Figura 25. Impacto na progressão tumoral do tratamento com diferentes combinações de quimioterápicos. **A)** Imagem representativa de bioluminescência de camundongos no 21º dia de tratamento; **B)** Progressão do volume tumoral medida ao longo de todo o curso do experimento. Cada ponto representa a média dos valores de volume tumoral dos animais de cada grupo (n=5) normalizado pelo volume tumoral do dia inicial do tratamento; **C)** Medida normalizada do volume tumoral no 21º dia após o início do tratamento. (**p<0,01 e ***p<0,001).

Por razões éticas, animais com grande carga tumoral foram sacrificados. Assim, pudemos observar também que usando a combinação de BSO, cisplatina e TMZ observamos um significativo aumento na sobrevivência dos animais, em torno de 3 vezes maior quando comparado com os grupos controle (**Figura 26**). Vale a pena acrescentar que no grupo de

animais tratados com BSO, cisplatina e TMZ – e somente nesse grupo – houve a regressão tumoral total em um dos animais.

Figura 26. Sobrevida dos animais com tumor xenográfico de glioma humano. Curva de sobrevivência dos animais albergando tumor U87MGLuc submetidos ou não a tratamento quimioterápico (único ou em combinação), os animais foram sacrificados assim que o volume tumoral alcançasse 4000 mm³.

4.4 Discussão

Os benefícios clínicos da cisplatina como um agente antitumoral são inquestionáveis, entretanto, a resistência tumoral à cisplatina continua ainda um grande desafio. Outro ponto de concordância é em relação a pífia eficácia do tratamento de pacientes com glioma. Uma vez que mesmo lançando mão de todos os recursos terapêuticos disponíveis como cirurgia, radioterapia e quimioterapia essa doença continua incurável. Claramente, é urgente e necessário buscar por novas alternativas para aperfeiçoar os protocolos de terapia para glioma.

Nesse estudo, diversos mecanismos bem caracterizados de resistência à cisplatina foram investigados em linhagens celulares de glioma humano, com o objetivo de estender o atual conhecimento de quais são os fatores decisivos que conferem resistência a essa droga. Dessa forma procuramos alternativas para alcançar um prognóstico mais favorável para pacientes com glioma.

O gene supressor de tumor p53 é comumente correlacionada com sensibilidade celular em relação a diversas drogas usadas para tratamento de câncer. A estabilização e ativação de p53 selvagem são críticos para indução de morte frente ao tratamento com cisplatina. Assim, células tumorais que são deficientes em p53 podem tornar-se resistentes à cisplatina por redução da apoptose dependente de p53 (Oren, Rotter, 2010). Por outro lado, deficiência em p53 pode sensibilizar células após a irradiação com UV e cisplatina. Mas os mecanismos pelos quais deficiências em p53 levam a morte celular frente à UV ou cisplatina são provavelmente diferentes. No caso de UV, p53 induz genes envolvidos em GGR na via de NER (Bowman et al., 2000), enquanto que no caso da cisplatina a função mais provável de p53 na proteção celular é a ativação da parada do ciclo celular, garantindo mais tempo para reparar os danos ao DNA, provavelmente não estando diretamente relacionada a reparo de DNA. Desse modo, alterações nas vias reguladas por p53 podem reduzir a eficácia do tratamento de câncer e estão relacionadas com a resistência a quimioterápicos (Madhusudan, Hickson, 2005). Diante disso, vários trabalhos apresentam resultados conflitantes de diferentes linhagens celulares em relação ao status de p53 e sensibilidade a cisplatina (Datta et al., 2004; Park et al., 2006; Tallen et al., 2008). Essas observações foram também documentadas em casos clínicos nos quais tumores demonstraram serem sensíveis ou resistentes a cisplatina independente do status de p53 (Weller, 1998). Em gliomas mutações no gene p53 ocorrem com uma frequência de mutação de 60 a 70% dos tumores (England et al., 2013).

No nosso estudo, usando quatro linhagens celulares distintas, duas com p53 selvagem e duas com p53 mutadas, nenhuma correlação entre o *status* de p53 e sensibilidade a cisplatina foi observada. De fato, ensaios de viabilidade celular, (determinados pelo método do XTT) e apoptose (população em sub-G1) revelaram que as células U251MG células (p53mt) são altamente sensíveis a cisplatina contrastando com a baixa sensibilidade de células U138MG, também mutadas em p53. Além disso, o silenciamento de p53 em células U87MG (p53wt) não provocou qualquer alteração na viabilidade celular após tratamento com cisplatina. Nossos resultados sugerem que a ausência de p53 funcional isoladamente não é suficiente para conferir resistência celular a cisplatina em células de glioma.

Adutos de cisplatina podem provocar grandes distorções na estrutura da molécula de DNA que bloqueiam a replicação e a transcrição que por sua vez levam a parada do ciclo celular ou mesmo apoptose. Adutos de cisplatina no DNA desencadeiam uma intrincada cascata de sinalização intracelular numa tentativa orquestrada das células livrarem-se das lesões no seu DNA. De maneira geral, após o tratamento com cisplatina ocorre a parada do ciclo celular, fazendo com o que a célula pare a sua replicação e também dando a célula tempo adequado para que os mecanismos de reparo lidem com os danos. Caso haja dificuldade no reparo ou haja uma quantidade excessiva de lesões, as células entram no processo de apoptose (Lord, Ashworth, 2012).

Certamente, a quimioterapia com cisplatina para câncer de testículo configura-se como um notável caso de sucesso terapêutico. Este foi o primeiro tipo de tumor em que a cisplatina foi utilizada clinicamente e obteve-se uma notável taxa de casos de cura, de fato para pacientes com diagnóstico precoce a cura era obtida em quase a totalidade dos casos (Hanna, Einhorn, 2014). Muitos estudos foram realizados com intuito de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos que pudessem explicar esse fenômeno. E foi demonstrado que na verdade a deficiência na via de NER em células de testículo é o fator determinante para a grande sensibilidade desse tipo de tumor à cisplatina. Assim, linhagens de testículo quando comparadas com linhagens de bexiga por exemplo tem menor capacidade de reparo de DNA, observado tanto no genoma global quanto em regiões de genes ativos (Köberle et al., 1997). O mesmo grupo também verificou que células de tumor de testículo apresentavam baixos níveis de XPA e ERCC1 e que com a restauração da proteína XPA as células tornaram-se resistentes à cisplatina (Köberle et al., 1999).

Também em células de tumor de ovário foi observado que células resistentes possuíam aumentada capacidade de remoção das lesões de cisplatina no DNA e também

sistema de tolerância a essas lesões mais robusto (Johnson et al., 1994). Essa mesma linhagem resistente também apresentava menor quantidade de platina no seu DNA do que células sensíveis (Johnson et al., 1994). Mais tarde, o mesmo fenômeno foi observado em tumor de pacientes com câncer de ovário os quais apresentaram uma habilidade maior de lidar com ICL causado pelo tratamento com cisplatina (Wynne et al., 2007).

Usando um conjunto de linhagens celulares sensíveis ou resistentes, foi visto que as linhagens resistentes à cisplatina eram também resistentes à UV e em ensaio *in vitro* foi detectada que a via de NER estava muito mais ativa nessa linhagem (Ferry et al., 2000). O ensaio de HCR com plasmídeos tratados com cisplatina revelou que células deficientes em XPC tem mais dificuldade em reparar lesões de cisplatina (Chen et al., 2003). Recentemente, foi observado que em linhagens de melanoma tratadas com cisplatina havia indução da expressão de XPC de uma maneira dependente de p53 (Barckhausen et al., 2013).

Mas, inegavelmente, uma das principais correlações entre sensibilidade à cisplatina e proteínas de NER é dada pela atividade das endonucleases ERCC1 e XPF. A ponto de que a expressão de ERCC1 ser considerado como importante marcador molecular na determinação do prognóstico clínico de câncer de pulmão. De fato, pacientes com tumor de pulmão de células não pequenas com expressão diminuída de ERCC1 se beneficiaram mais do tratamento com cisplatina do que pacientes que tinham tumores com alta expressão de ERCC1 (Olaussen et al., 2006). Isso porque ERCC1 e XPF agem não só na via de NER mas também atuam na via de HR que é importante mecanismo de reparo das lesões do tipo ICL. De fato, usando o tecnologia de RNA de interferência (siRNA) para inibição da tradução proteica, foi demonstrado que em células tratadas com cisplatina a diminuição de ERCC1 teve maior impacto na sobrevivência celular do que a diminuição dos níveis proteicos de XPA (Cummings et al., 2006). Além disso, em células de tumor de ovário foi verificado que em resposta a cisplatina havia um aumento da expressão de ERCC1 em torno de 6 vezes (Li et al., 1998) e também um aumento na capacidade de reparo de DNA (Li et al., 2000) num processo de defesa da célula para lidar com as lesões causadas por cisplatina. Em outros trabalhos, baixos níveis de mRNA de ERCC1 em adenocarcinomas gástrico e em câncer de pulmão mostraram-se associados com uma melhor sobrevivência dos pacientes tratados com cisplatina em combinação com fluorouracil e gencitabina (Metzger et al., 1998; Lord et al., 2002).

Os adutos de DNA são reconhecidos e reparados pela via de NER. Desta forma, a atividade de NER constitui um fator chave na defesa celular frente ao tratamento com

cisplatina (Martin et al., 2008). Nesse sentido, uma maior capacidade de reparo de DNA para lidar com as lesões causadas pela cisplatina é outro mecanismo crucial de resistência. Muitos estudos demonstraram que células resistentes são capazes de remover mais rapidamente adutos de cisplatina do que células sensíveis (Ferry et al., 2000; Parker et al., 1991) ou, inversamente, demonstraram uma associação entre alta sensibilidade a cisplatina e reduzida atividade da via de NER (Selvakumaran et al., 2003). Entretanto, no presente estudo, nenhuma diferença foi observada em relação a capacidade de reparo de DNA entre as 4 linhagens, como indicado pela taxa de reativação da expressão do gene repórter luciferase. Isto implica que a uma maior eficiência de reparo de DNA de adutos de cisplatina não podem explicar a resistência da linhagem U138MG à cisplatina.

As células que compõem o cérebro humano consomem em torno de 20% de todo o oxigênio utilizado pelo corpo sendo que o cérebro constitui apenas 2% do massa do organismo. Assim, o cérebro de um adulto é o órgão que mais consome oxigênio e como resultado, gera grande quantidade ROS (Dringen, Hamprecht, 1998). Quando há um desbalanço entre a geração de ROS e sua eliminação a célula entra num estado de estresse redox que pode ser extremamente prejudicial para a célula, uma vez que ROS podem interagir com várias moléculas biológicas, como lipídeos, proteínas e DNA. Não é surpreendente, então, que as células que compõem os cérebro contenham com um grande arsenal de agentes antioxidantes (Dringen, 2000).

Detoxificação da cisplatina por GSH geralmente ocorre pela reação catalisada pela enzima glutathione-S-transferase, em que GSH liga-se covalentemente a cisplatina, sendo exportada para fora da célula, e assim prevenindo que a droga alcance seu alvo molecular principal, a molécula de DNA (Chen, Kuo, 2010b). Assim, a platinação do DNA é fortemente associado com a eficácia da cisplatina, em outras palavras, quanto maior quantidade de adutos de cisplatina no DNA, melhores serão os resultados no tratamento com cisplatina (Hoebbers et al., 2006; van de Vaart et al., 2000).

BSO há bastante tempo tem sido usado como potente inibidor específico da síntese de GSH e trabalhos anteriores mostraram que, de fato, BSO em associação com cisplatina foi capaz de aumentar a citotoxicidade de várias linhagens celulares resistentes (Byun et al., 2005; Rudin et al., 2003). Também é importante ressaltar que BSO associado com melfalan, também um agente alquilante, foi utilizado em diversos testes clínicos (Calvert et al., 1998) (O'Dwyer et al., 1996). Em um desses testes clínicos a infusão contínua por 24 h de BSO em pacientes com mieloma em estágio avançado mostrou que havia grande diminuição dos níveis de GSH especialmente nas células tumorais e que a administração dessa droga não foi

tóxica para os pacientes, sendo a combinação entre BSO e melfalan bem tolerada pelos pacientes, havendo somente relatos ocasionais de vômitos e náuseas (Bailey et al., 1997). Num estudo de fase I recente com 32 pacientes em estágio avançado de neuroblastoma e refratário ao tratamento convencional, verificou-se que a infusão de BSO em combinação com melfalan foi bem tolerada e 6 pacientes mostraram-se responsivos ao tratamento (Anderson et al., 2015).

No presente estudo, mostramos que a inibição da síntese de GSH por BSO foi capaz de minimizar a resistência à cisplatina em células de glioma. E demonstramos que a potencialização da morte celular pela combinação cisplatina e BSO era devido ao aumento da indução dos danos de DNA provocados por cisplatina.

O regime de tratamento com TMZ mostrou-se eficaz e rapidamente substituiu o uso de agentes alquilantes como ACNU e BCNU. Desta forma, TMZ foi adotado como agente quimioterápico de primeira linha no tratamento de pacientes com diagnóstico de glioblastoma. De fato, pacientes com glioma responderam bem ao tratamento com TMZ e, quando este era administrado em combinação com radioterapia e cirurgia, um aumento significativo na taxa de sobrevida após 2 anos foi observada (27% versus 10%) (Stupp et al., 2005). Assim como a cisplatina, TMZ também tem como alvo terapêutico a molécula de DNA. Esse agente causa diversos tipos de lesões no DNA através da metilação de nucleotídeos, sendo particularmente deletério para as células o produto O₆-metilguanina (O₆MeG) (Nagasawa et al., 2012). Esse tipo de lesão é diretamente reparada pela enzima suicida MGMT, que remove o grupo metil da base do DNA e transfere para a seu resíduo de cisteína (Pegg, 2000). Como consequência, a enzima MGMT tem importante papel na promoção da resistência à TMZ. De fato, metilação no promotor do gene *MGMT*, levando a redução de sua expressão, é considerado um importante marcador de eficácia terapêutica em pacientes tratados com TMZ (Kaina et al., 2007). Observou-se uma forte correlação entre metilação do promotor de *MGMT* e resposta ao tratamento com TMZ em teste clínico randomizado de fase III (Hegi et al., 2005). Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento com cisplatina é capaz de reduzir a atividade de MGMT, bem como sua expressão (D'Atri et al., 2000). Esses achados podem explicar o sinergismo observado entre cisplatina e TMZ. Muitos testes clínicos reportaram a combinação de cisplatina com TMZ como uma alternativa válida para o tratamento de gliomas refratários ou recorrentes (Brandes et al., 2004; Silvani et al., 2004; Zustovich et al., 2009).

No presente trabalho, demonstramos que a resistência celular à TMZ foi revertida após combinação com BSO, enquanto que NAC preveniu a citotoxicidade de TMZ. Isto está

de acordo com trabalho anterior que mostrou que a resistência à TMZ em glioma estava associada com baixa produção de ROS pela célula resistente (Oliva et al., 2011). Outro trabalho recente também indicou que BSO pode potencializar a toxicidade induzida por TMZ em células de glioma (Kohsaka et al., 2014).

Neste trabalho, nós fomos além de verificar sensibilidade e demonstramos que células depletadas em GSH, TMZ induz maior quantidade de danos no DNA, verificado por marcação de γ H2AX. Assim, nós especulamos que uma vez que TMZ gera íons carbênio, esses íons podem ser sequestrados por moléculas que contenham grupo SH, como GSH, e isso pode ser um importante mecanismo de detoxificação do TMZ (**Figura 27**). Discutiremos melhor esse mecanismos no Capítulo 3.

A

B

Figura 27. Modelo proposto do papel de GSH na resistência a cisplatina e TMZ e como contornar a resistência. Cisplatina e TMZ têm como principal alvo terapêutico a molécula de DNA. GSH liga-se covalentemente a cisplatina que é então exportada para fora da célula, diminuindo, assim a interação cisplatina e DNA. GSH atua também na resistência a TMZ, podendo fazer o papel de detoxificação direta pela ligação com TMZ ou pode neutralizar os ROS gerados pelo tratamento com TMZ. **B)** Com a adição de BSO há a depleção dos níveis de GSH, gerando mais dano no DNA e consequentemente mais morte celular.

Além disso, a depleção de GSH por BSO potencializou fortemente a morte celular induzida por TMZ e cisplatina. E notavelmente, verificamos uma substancial inibição da progressão tumoral de modelo xenográfico de glioma com a utilização do tratamento combinatório entre BSO, cisplatina e TMZ, com obtenção de completa regressão tumoral em alguns dos animais.

O modelo tumoral inoculado no flanco dos animais não é o ideal para mimetizar o tumor cerebral em pacientes. Mas é importante ressaltar que o BSO é capaz de passar a barreira hematoencefálica por difusão passiva e foi mostrado em modelo de glioma intracranial havia concentração entre 4 a 30 vezes maior de BSO nas células tumorais em relação ao tecido normal (Fekete et al., 1990). Cisplatina também é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica mas de forma limitada (Deeken, Löscher, 2007). Mas um estudo com pacientes com glioma mostrou assim como BSO, cisplatina tende a acumular nas células tumorais (Stewart et al., 1982). Dessa forma, mesmo que estudos adicionais com modelo de tumor intracranial, sejam necessários, acreditamos que a combinação entre as 3 drogas tem potencial eficácia clínica.

Assim, o uso de cisplatina e TMZ em baixas doses pode atenuar os efeitos colaterais provocados por essas drogas e, uma vez combinadas com BSO, cisplatina e TMZ revelaram um efeito sinérgico em células de glioma, o que pode melhorar o êxito do tratamento dos pacientes (**Figura 27**).

Em conjunto, os dados apresentados aqui indicam que uma alta concentração de GSH protege as células dos efeitos citotóxicos desencadeados por cisplatina e TMZ. Pela primeira vez, foi demonstrado que a depleção de GSH associada com o tratamento com cisplatina e TMZ aumenta substancialmente a morte celular em células de glioma. Desta forma, propomos que a concentração intracelular de GSH como um potencial marcador molecular para resistência a cisplatina e TMZ. E o uso de inibidores de GSH, como o BSO, em associação com esses quimioterápicos apresenta-se como uma abordagem terapêutica promissora para combater tão devastador tumor.

CAPÍTULO 3

5 EXPLORANDO O PAPEL DA GLUTATIONA NA RESISTÊNCIA A TEMOZOLAMIDA

5.1 Temozolamida

TMZ é o principal agente quimioterápico no tratamento de gliomas e é também utilizado para tratar melanoma metastático. O TMZ foi desenvolvido nos anos 90 para superar as deficiências do agente alquilante dacarbazina (DTIC). O DTIC mostrou ter potente efeito antitumorigênico em modelos animais, mas sua eficácia em humanos como vimos no Capítulo 1, mostrou-se bastante baixa, principalmente devido a baixa ativação metabólica e pelos altos índices de mielossupressão (Newlands et al., 1997). Em pH fisiológico TMZ é metabolizado não enzimaticamente gerando MTIC (um intermediário também gerado pelo metabolismo enzimático de DTIC) e, após vários passos, gera o íon reativo metildiazônio. Esse íon reativo uma vez em contato com o DNA adiciona um grupo metil a bases nitrogenadas (Kaina et al., 2007).

O fato do TMZ ser estável em pH ácido faz com que essa droga possa ser utilizada por via oral, e como mencionado anteriormente, TMZ é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Além disso, tem sido sugerido que o pH um pouco mais básico do cérebro aumenta a eficácia de ativação do TMZ (Newlands et al., 1997).

TMZ produz uma ampla gama de lesões no DNA sendo que o principal produto é a metilação da guanina na posição N7 (80-85%), seguida pela metilação da adenina na posição N3 (8%) e metilação da guanina da posição O6 (8%). N₇-metilguanina (N₇-meG) não é considerada lesão tóxica ou mutagênica mas pode levar ao aumento da depuração da guanina gerando a formação de sítios abásicos, estes sim por sua vez exibem propriedades mutagênicas e tóxicas uma vez que bloqueiam a replicação do DNA. N₃-metiladenina (N₃-meA) é uma lesão tóxica e mutagênica que induz o bloqueio da replicação e a transverso de A:T para T:A. Entretanto, a eficácia do TMZ como um agente que danifica o DNA resulta primariamente da formação da lesão O₆-metilguanina (O₆-meG).

Assim como visto para cisplatina, foi observado que tumores tratados com TMZ contavam com diversos mecanismos de resistência a esse quimioterápico. A seguir iremos descrever os principais deles.

5.2 Mecanismos de resistência a TMZ

5.2.1 MGMT

Uma vez que o principal alvo terapêutico do TMZ é o DNA, tem sido demonstrado que elevada capacidade de reparo do DNA está altamente relacionado com resistência a essa droga. MGMT é capaz de fazer a reversão direta da lesão tóxica O₆-meG – sem auxílio de nenhuma outra enzima ou co-fator – pela transferência do metil da posição O6 da guanina para a cisteína presente na sua porção catalítica. E com menor eficiência MGMT faz a transferência do metil da posição O4 da timina (O₄-meT) sendo que essa lesão é induzida em baixos níveis por TMZ (Gerson, 2004). A reação catalisada por MGMT é extremamente rápida, levando menos de 2 s em condições fisiológicas (Lindahl et al., 1982). Entretanto, após a incorporação de um metil, MGMT é inativada e levada a degradação pelo proteassomo, sendo considerada, desta forma, uma enzima suicida. Isso implica que uma molécula de MGMT consegue reparar uma única lesão do tipo O₆-meG.

Devido a sua capacidade de reparo direto, os níveis de MGMT têm um profundo efeito na sobrevivência celular após tratamento com TMZ. De fato, muitos estudos demonstraram uma robusta relação inversa entre expressão de MGMT e sensibilidade a TMZ *in vitro* e *in vivo* (Hegi et al., 2008; Weller et al., 2010; Wiewrodt et al., 2008). O status de MGMT também tem alta relevância clínica. Assim pacientes que não expressam MGMT devido a silenciamento epigenético tiveram um aumento de 6 meses na sobrevida com o tratamento com TMZ e radioterapia (Hegi et al., 2005). A inativação farmacológica de MGMT pela droga O₆-benzilguanina tem sido testada como agente potencializador do tratamento com TMZ em gliomas. Um estudo com administração local do inibidor em pacientes com glioma mostrou que a combinação entre TMZ e inibidor de MGMT trazia benefícios clínicos (Koch et al., 2007). Entretanto, um estudo clínico de fase II com pacientes com gliomas recorrentes resistentes ao tratamento com TMZ, mostrou que a combinação entre TMZ e O₆-benzilguanina não foi capaz de reverter a resistência desses tumores, sendo que somente 1 dos 34 pacientes do estudo mostrou-se responsivo ao tratamento (Quinn et al., 2009).

5.2.2 BER

A via de BER repara eficientemente tanto N₇-meG quanto N₃-meA, que são as lesões mais prevalentes provocadas por TMZ. Esse mecanismo de reparo de DNA é iniciada por enzimas glicosilases que possuem substratos específicos que reconhecem o dano no DNA e fazem a remoção da base modificada pela quebra da ligação N-glicosídica (Wilson III, Barsky, 2001). Ambas lesões, N₇-meG e N₃-meA, são substratos para alquiadenina DNA glicosilase (AAG, do Inglês, alkyladenine DNA glycosylase). Além disso, N₃-meA pode ser substrato para NER especialmente quando AAG está em baixas concentrações (Fu et al., 2012).

Foi demonstrado que o nível de expressão de AAG é capaz de alterar a resposta de gliomas a TMZ (Paik et al., 2005). Assim, células tumorais com baixa expressão de AAG mostraram-se sensíveis ao tratamento com TMZ. Por outro lado, foi demonstrado que altos níveis de AAG em gliomas estavam significativamente correlacionado com pior prognóstico para o paciente (Agnihotri et al., 2012). Uma explicação para esses achados é que os produtos intermediários do reparo (como sítios abásicos) são na verdade mais tóxicos do que a lesão inicial.

PARP-1 é uma outra enzima importante na via de reparo de via de BER. Essa enzima, na presença de SSB, é ativada e ocorre a sua ligação ao DNA e subsequente transferência de grupos (ADP)ribose para histonas e DNA polimerases numa reação dependente de NAD⁺. Um dos principais efeitos biológicos da ativação da PARP-1 é o relaxamento da estrutura do DNA, facilitando que enzimas de reparo cheguem ao local da lesão. Devido a participação de PARP-1 no processo de reparo de DNA especulou-se que a inibição dessa enzima seria um alternativa interessante para o tratamento de tumores. De fato, muitos são os estudos clínicos que empregam diferentes tipos de inibidores de PARP (Ratnam, Low, 2007). E em dezembro de 2014 foi aprovado pelo FDA o primeiro inibidor de PARP (olaparib) para o tratamento de pacientes com câncer de ovário com mutação em genes BRCA. Nenhum estudo clínico de fase III foi realizado em pacientes com glioma ou melanoma. Estudo de fase I em melanoma indicou que o inibidor de PARP-1 (AG014699) é bem tolerado por pacientes (Plummer et al., 2008). Assim, são necessários mais estudos para determinar se pacientes com glioma ou melanoma se beneficiariam da combinação TMZ e inibidor de PARP-1.

5.2.3 MMR

Apesar de representar não mais do que 8% do total de alquilações induzidas por TMZ, a lesão do tipo O₆-meG é reconhecida como sendo a mais tóxica entre todos os danos produzido por essa droga, sendo esta lesão potente indutora de morte celular por apoptose (Kaina et al., 1997). Importante notar que a toxicidade da lesão O₆-meG depende do funcionamento da via de MMR (Cejka et al., 2003). Durante a replicação do DNA, a polimerase replicativa insere uma timina em oposição a O₆-meG criando um mal pareamento de bases que é reconhecido pela maquinaria de MMR. Atualmente existem dois modelos para explicar como o processamento de O₆-meG pelo sistema MMR leva a citotoxicidade. O modelo de sinalização direta propõe que o reconhecimento do mal pareamento pelo MMR leva diretamente a ativação de ATM e ATR o que por sua vez leva a parada do ciclo celular e caso a parada persista leva a morte celular (Yoshioka et al., 2006). O segundo modelo conhecido como modelo do ciclo fútil, propõe que a toxicidade da O₆-meG é dependente de repetidos ciclos de processamento do MMR. Assim, após o reconhecimento das bases mal pareadas O₆-meG:T por MutS α , o recrutamento de MutL α e EXO1 leva a excisão de um pedaço da fita de DNA contendo a timina oposta a O₆-meG, criando um *gap* de DNA de fita simples. Para finalizar o reparo uma DNA polimerase preenche esse *gap*, mas uma vez mais inserindo uma timina em oposição a O₆-meG, o que por sua vez induz novamente o reparo por MMR. Esse fenômeno, conhecido como ciclo fútil, leva ao acúmulo de fitas simples de DNA que podem gerar quebras duplas durante a replicação o que por sua vez pode induzir a morte celular (Noonan et al., 2012).

Por outro lado vários estudos mostraram que deficiências no sistema de reparo MMR levam a resistência a TMZ em células de gliomas (Happold et al., 2012), sendo que mesmo pequenas mudanças na expressão de genes de MMR já são suficientes para causar grande impacto na resistência a TMZ (McFaline-Figueroa et al., 2015).

Entretanto, apesar do tratamento agressivo e multimodal, o prognóstico de pacientes com glioma e melanoma continua muito pobre. Isso é um forte indicativo de que outros mecanismos podem estar contribuindo para a determinação da resistência a TMZ. Por isso acreditamos que é de vital importância desvendar os mecanismos que estão por trás da resistência a TMZ e com isso determinar estratégias de intervenção para que assim o tumor responda ao tratamento e resulte na cura do paciente.

Assim, os resultados obtidos de maior indução de morte celular através da combinação entre TMZ e BSO, bem como a proteção de NAC contra os efeitos de TMZ,

nos fez levantar a hipótese de que GSH estaria tendo papel relevante em conferir resistência a essa droga.

O fator de transcrição NRF2 é reconhecidamente um dos principais reguladores celulares da expressão de moléculas com funções antioxidantes (Sporn, Liby, 2012). NRF2 controla a expressão de enzimas responsáveis pela produção de GSH (GCLM e GCLC que juntos formam o GCL). NRF2 também induz a expressão de xCT que é o transportador de cisteína/glutamato controlando assim disponibilidade de cisteína que é o fator limitante na síntese de GSH (Sasaki et al., 2002). A expressão de glutathione redutase (GR), responsável pela redução da GSSH para GSH, é também modulada por esse fator de transcrição. Mas NRF2 não só controla a síntese e regeneração como também a utilização de NRF2, uma vez que induz a expressão de vários genes de detoxificação de ROS como glutathione peroxidase (GPX) e várias glutathione S-transferases (GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA5, GSTM1, GSTM2, GSTM3 e GST π) (Sporn, Liby, 2012). Em situação de homeostase, NRF2 está ligado à KEAP1 (do Inglês, *Kelch-like ECH associated protein 1*) e é constitutivamente levado a degradação no proteassomo. Sob condições de estresse oxidativo, KEAP1 é modificado por oxidação não podendo mais ligar-se a NRF2, que então é translocada para o núcleo. Lá, NRF2 liga-se ao elemento responsivo antioxidante (ARE, do Inglês *Antioxidant Response Element*) que são sequências presentes nos promotores dos genes ligados a defesa antioxidante celular. Sendo que existem mais de 100 genes que são regulados por NRF2. Além de GSH, NRF2 controla a expressão de outros agentes antioxidantes como: tioredoxina, NADPH oxidases e hemoxygenase, bem como é capaz de induzir proteínas de bombas de efluxo.

5.3 Resultados

5.3.1 U138MG possui maiores níveis de mRNA de NRF2, GCLM e GST π do que U87MG

Como anteriormente descrito, o fator de transcrição NRF2 exerce papel fundamental na resposta protetora contra agentes oxidativos e é o principal fator indutor da síntese de GSH. Uma vez que verificamos diferenças significativas dos níveis de GSH entre as linhagens de glioma, nos perguntamos se esse fato era devido a uma diferença de expressão de Nrf2. Assim, a fim de avaliarmos essa questão, primeiramente realizamos ensaio de PCR em tempo real para verificar os níveis de mRNA desse gene nas linhagens sensível e resistente a TMZ. Como podemos ver na **Figura 28**, a linhagem U138MG conta com aproximadamente 4 vezes mais mRNA de Nrf2 do que a linhagem U87MG (**Figura 28A**). E mais importante, verificamos que genes alvos de NRF2 relacionados com metabolismo de GSH, como o do gene relacionado a síntese de GSH (GCLM) e também do gene relacionado a detoxificação celular dependente de GSH (GST π) estavam significativamente presentes em maior quantidade na linhagem resistente do que na linhagem sensível a TMZ (**Figura 28B-C**).

Figura 28. Perfil de expressão de genes relacionados a GSH em células de glioma. A-C) Análise dos níveis basais de mRNA dos genes *NRF2*, *GCLM* e *GST π* em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) realizada por PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média de 3 experimentos independentes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5.3.2 TMZ induz a expressão de mRNA de NRF2, GCLM e GST π

Estudos anteriores mostraram que os níveis de NRF2 aumenta após tratamento com TMZ (Cong et al., 2014; Zhou et al., 2013b). Assim, nos perguntamos se TMZ é capaz de induzir a expressão desse fator de transcrição nas linhagens de glioma humano em questão. Para tanto, as células foram tratadas com 300 μ M de TMZ e coletadas após 4 h de incubação. A análise do PCR em tempo real mostrou que de fato em ambas as linhagens tumorais o tratamento com TMZ foi capaz de aumentar de forma significativa os níveis de mRNA de NRF2. Também verificamos o mesmo perfil de maior expressão relativo aos mRNA de GCLM e GST π após tratamento com TMZ (**Figura 29**).

Figura 29. Perfil de expressão de genes relacionados a GSH em células de glioma após tratamento com TMZ. **A-C)** Expressão dos genes *Nrf2*, *GCLM* e *GST π* em células U87MG e **(D-F)** em células U138MG, após tratamento com 300 μ M de TMZ. As amostras foram coletadas 4 h após o início do tratamento e foram analisadas por PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média de 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.3 TMZ aumenta os níveis proteicos de NRF2

Como descrito na anteriormente, NRF2 em níveis basais está ligado ao KEAP1 e é constantemente levado a degradação. Desta forma, não é possível afirmar se há maior quantidade de

NRF2 somente com os dados de mRNA. Assim, para confirmar a diferença basal de expressão de NRF2 entre as linhagens, bem como a indução de NRF2 por TMZ realizamos ensaio de *Western blot* para identificar a expressão proteica de NRF2. Na **Figura 30A-B**, podemos observar primeiramente que há uma diferença significativa na expressão proteica de NRF2 basal (célula não tratada) entre as células de glioma, tendo a linhagem U138MG maiores níveis de NRF2 do que U87MG. Em segundo lugar, houve de fato aumento da expressão proteica de NRF2 após tratamento com 300 μ M de TMZ por 24 h em ambas as linhagens: aumento de cerca de 3 vezes na linhagem U87MG e de 2 vezes na linhagem U138MG.

Figura 30. Modulação dos níveis de NRF2 após tratamento com TMZ. **A)** Detecção de NRF2 em células de glioma U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) tratadas com 300 μ M de TMZ. As amostras foram coletadas 24 h após o início do tratamento e analisadas por *western blot*. **B)** Quantificação da expressão proteica de NRF2 em células U87MG e U138MG submetidas ou não ao tratamento com TMZ. Os dados de NRF2 foram normalizados pela expressão de GAPDH referente a cada linhagem e em seguida os dados foram normalizados pela razão NRF2/GAPDH verificada na linhagem U87MG. Os experimentos de *Western blot* foi realizado por 2 vezes e o gráfico representa a media desses experimentos independentes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5.3.4 TMZ gera ROS intracelular

Esses resultados sugerem que há de fato uma regulação da expressão de NRF2 por TMZ. Uma vez que NRF2 é reconhecidamente um dos principais fatores de transcrição envolvidos na resposta antioxidante, nós especulamos se essa modulação da expressão de NRF2 pelo TMZ seja devido ao fato de que essa droga esteja gerando de forma direta ou indireta ROS intracelulares.

Para testar a hipótese de geração de ROS por TMZ nessas linhagens tumorais, as células foram tratadas com 300 μM de TMZ, as amostras foram coletadas em diferentes tempos e em seguida foi avaliada a quantidade de ROS utilizando a sonda fluorescente DCFDA. De fato, como mostrado na **Figura 31A**, houve aumento na geração de ROS após tratamento com TMZ (cerca de 2 vezes em relação a amostra não tratada após 120 min), mas curiosamente esse aumento só foi observado na linhagem sensível, sendo que na linhagem U138MG observamos na verdade um decréscimo nos níveis de ROS (**Figura 31A**). Uma possível explicação para esse fato é que como vimos no Capítulo 2, a linhagem U138MG possui níveis maiores de GSH quando comparada a U87MG, o que conferiria uma maior proteção antioxidante. Para testarmos essa hipótese, tratamos essas mesmas células com 100 μM peróxido de hidrogênio (H_2O_2), potente indutor de estresse oxidativo, e observamos que as células U138MG após tratamento com H_2O_2 tinha níveis bem mais baixos de ROS do que as células U87MG (**Figura 31B**), indicando maior proteção antioxidante na linhagem U138MG quando comparado com a linhagem U87MG.

Figura 31. Geração de ROS após tratamento com TMZ e H_2O_2 em células de glioma. **A)** As linhagens U87MG e U138MG foram tratadas com 300 μM de TMZ e coletadas após 30, 60 ou 120 min. Após esse período as amostras foram incubadas com 10 μM de DCFDA e logo em seguida foram submetidas a análise por citometria de fluxo. **B)** As células de glioma foram tratadas com 100 μM de H_2O_2 por 1 h, incubadas com DCFDA e analisadas por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam a média de 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.5 TMZ induz a produção de tióis

Em seguida, avaliamos se o tratamento com TMZ além de aumentar os níveis de NRF2 também seria capaz de modular os níveis de GSH, um dos principais agentes antioxidantes celulares em que os níveis são regulados por esse fator de transcrição. Para tanto, quantificamos o níveis de tióis (grupo –SH), sendo que na célula esse grupo –SH está presente em maior quantidade na molécula de GSH. Na **Figura 32** é possível verificar que os níveis basais de tióis na linhagem resistente (U138MG) é maior do que os níveis de –SH encontrados na linhagem U87MG, corroborando os dados anteriores de medida de GSH intracelular quantificados de forma direta (**Figura 13**). E além dessa observação, verificamos também que o tratamento com TMZ triplicou e quase que dobrou os níveis de tióis presentes nas linhagens U87MG e U138MG, respectivamente (**Figura 32**).

Figura 32. Indução da concentração de tióis por TMZ. Quantificação dos níveis de tióis intracelulares em células U87MG e U138MG sem tratamento (Ctrl) ou tratadas com 300 μ M de TMZ por 24 h. A quantificação de tióis foi realizada em triplicada e os dados representam a média de 2 experimentos independentes (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.3.6 Aumento da geração de ROS após tratamento com TMZ e BSO

A fim de avaliarmos se GSH teria um papel importante na defesa antioxidante contra os efeitos pró-oxidantes do TMZ, modulamos os níveis de GSH intracelular pela adição de BSO e NAC (inibidor da síntese e precursor de GSH, respectivamente). Assim, avaliamos a geração de ROS pelas linhagens de glioma após tratamento simples de TMZ ou em combinação com BSO ou NAC. Como podemos observar na **Figura 33** com a adição de BSO houve acréscimo de ROS em relação ao controle em ambas linhagens celulares enquanto que a adição de NAC contribuiu para uma pequena redução dos níveis basais de ROS. Já em relação aos níveis de ROS após a combinação entre as drogas, verificamos que

na combinação TMZ e NAC houve menor geração de ROS quando comparado com o tratamento simples com TMZ, contrastando com o que foi observado com a combinação entre TMZ e BSO em que houve grande indução de ROS, maior do que a soma dos níveis de ROS produzidos pelas drogas como agentes simples. Assim, esse resultado confirma que GSH está atuando como agente protetor celular, mitigando o estresse oxidativo induzido por TMZ.

Figura 33. Geração de ROS após tratamento com BSO, NAC e TMZ. As linhagens U87MG e U138MG foram pré-tratadas com BSO (100 μ M) ou NAC (1 mM) e em seguida foi adicionado 300 μ M de TMZ. As amostras foram coletadas 2 h após o tratamento com TMZ. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

5.3.7 Aumento de lesões oxidativas no DNA genômico após tratamento com TMZ e BSO

Outros grupos já mostraram que TMZ é capaz de gerar estresse oxidativo, talvez pela indução de dano no DNA mitocondrial por esse agente, o que levaria ao mau funcionamento mitocondrial e consequentemente maior geração de ROS (Wang et al., 2013). Sendo assim, nós estávamos interessados em verificar se essa geração de ROS pelo tratamento com TMZ era capaz de induzir danos oxidativos no DNA genômico. Para tanto, realizamos ensaio de cometa neutro com adição da enzima FPG que é uma DNA glicosilase que reconhece nucleotídeos contendo lesões oxidativas, como por exemplo 8-oxoG, clivando a ligação fosfodiéster, gerando assim uma quebra de fita simples (Prakash et al., 2012). Após corrida de eletroforese do DNA genômico verificamos que TMZ gera grande quantidade de sítios

sensíveis ao corte da FPG, ou seja, TMZ gera de fato lesões oxidativas no DNA genômico (**Figura 34**). Verificamos ainda que a combinação de TMZ e BSO potencializou a geração de lesões oxidativas no DNA genômico quando comparado com os níveis induzidos por TMZ sozinho (**Figura 34**). Em conjunto esses dados indicam que ROS podem realmente estar contribuindo para a citotoxicidade de TMZ em células de glioma humano e mais importante, GSH tem papel central na determinação da resistência a esse quimioterápico.

+ FPG

Figura 34. Dano no DNA após tratamento com TMZ e BSO. Imagem representativa do ensaio de cometa neutro das células U138MG tratadas com 300 μ M de TMZ sozinho ou em combinação com pré-tratamento com 100 μ M de BSO. As amostras foram coletadas 2 h após o tratamento com TMZ e incubadas com DNA glicosilase FPG por 30 min, após esse período foram submetidas a corrida de eletroforese. As amostras foram coradas com brometo de etídio e as imagens foram feitas por microscopia de fluorescência.

5.3.8 Silenciamento de NRF2 sensibiliza a linhagem U138MG ao tratamento com TMZ

Como visto na **Figura 30**, a linhagem resistente (U138MG) tinha níveis basais maiores de NRF2 do que a linhagem sensível. Nós então levantamos a hipótese de que NRF2 teria papel fundamental na resistência a TMZ uma vez que esse fator de transcrição controla diversos genes envolvidos na proteção contra agentes pró-oxidantes, em especial os níveis de GSH bem como a sua utilização. Para testarmos essa hipótese, estabelecemos uma linhagem silenciada para o gene Nrf2 utilizando o sistema de silenciamento por transdução lentiviral. Após seleção com puromicina, realizamos ensaio de *Western blot* para avaliar o níveis de silenciamento proteico nas linhagens U138MG shNRF2 comparado com a linhagem transduzidas com o lentivírus carregando uma sequência de *short hairpin* randômica (PLKO). Na **Figura 35A** podemos claramente verificar que houve verdadeiramente substancial silenciamento de NRF2 na linhagem U138MG shNRF2.

Notavelmente, observamos que na linhagem silenciada para NRF2 havia significativa diminuição dos níveis de tióis intracelulares quando comparado com os níveis exibidos pela célula controle. Em seguida, submetemos essas linhagens ao tratamento com doses crescentes de TMZ e após 72 h realizamos ensaio de XTT para avaliar a viabilidade celular. Como mostrado na **Figura 35C**, na linhagem NRF2 silenciada houve um grande diminuição na sobrevivência celular após tratamento com TMZ quando comparado com os níveis de viabilidade celular exibidos pela linhagem controle.

Figura 35. Silenciamento de *Nrf2* na linhagem U138MG e seu efeito na sensibilidade a TMZ.

A) Detecção da proteína NRF2 por *Western blot* na linhagem U138MG transduzidas com shRNA controle (PLKO) ou com shNRF2; **B)** Quantificação dos níveis de tióis intracelulares nas linhagens U138MG PLKO e U138MG shNRF2; **C)** Análise da viabilidade celular pelo ensaio de XTT das linhagens U138MG PLKO e U138MG shNRF2 72 h após tratamento com doses crescentes de TMZ. O ensaio de *Western blot* foi realizado por 2 vezes e os ensaios de quantificação de tióis e XTT foi realizado em triplicata e os dados representam a média de 3 experimentos independentes.

Além da diminuição da viabilidade celular, verificamos que na linhagem U138MG shNRF2 tratadas com TMZ apresentam maior porcentagem de células em sub-G1 do que na linhagem U138MG controle (**Figura 36A-B**). Também confirmamos a maior indução de apoptose por TMZ em células silenciadas para NRF2 pela análise por citometria de fluxo de células marcadas positivamente para caspase 3 ativada (**Figura 36C**). E ainda observamos uma maior quantidade de danos no DNA (γ H2AX) na linhagem silenciada do que na linhagem controle (**Figura 36D**).

Figura 36. Respostas celulares das linhagens U138MG e U138MG shNRF2 ao tratamento com TMZ. **A)** Histograma representativo da população em sub-G1 das linhagens U138MG e U138MG shNRF2 marcadas com PI. As células foram tratadas com 100 μ M de TMZ e submetidas a análise por citometria de fluxo 72 h após tratamento; **B)** Quantificação da população em sub-G1; **C-D)** Quantificação da porcentagem de células marcadas positivamente contra caspase 3 ativada e contra γ H2AX, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam a média de 2 experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.3.9 Inibidor de GST π , Ezatiostat (EZA), potencializa a morte celular induzida por TMZ

Nossos dados apontam para um papel crucial de GSH na resistência a TMZ. Entretanto, GSH pode estar atuando de 2 maneiras diferentes para promover a quimiorresistência: i) GSH pode estar agindo como agente antioxidante e assim neutralizando os ROS gerados por TMZ; ii) GSH pode estar atuando como agente detoxificante, em mecanismo igual ao descrito anteriormente com a cisplatina, em que GSH liga-se ao TMZ através da ação da GST e é então transportada para fora da célula.

Para testarmos se GST teria papel importante na resistência a TMZ utilizamos um inibidor específico de GST π , o ezatiostat (EZA). Assim, em combinação com TMZ, EZA

potencializou a morte celular induzida por TMZ tanto na linhagem de glioma resistente quanto na sensível a TMZ (**Figura 37**). Esse dado indica que GST é um dos meios utilizados pela célula para proteger-se dos efeitos citotóxicos de TMZ.

Figura 37. Sensibilidade das linhagens de glioma humano ao tratamento com TMZ e EZA. Perfil de viabilidade celular de linhagens de glioma humano (U87MG e U138MG) pré-tratadas com EZA (5 μM) por 16 h e em seguida tratadas com doses crescentes de TMZ. 3 dias após o tratamento com TMZ foi realizado ensaio de XTT, que foi realizado em triplicata. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

5.3.10 BSO e EZA potencializam a morte celular induzida por TMZ em linhagens de melanoma humano e murino

Como descrito no Capítulo 1, glioma e melanoma dividem várias características em comum: são tumores altamente agressivos, pouco responsivos à quimioterapia, devido principalmente ao desenvolvimento de quimiorresistência. TMZ é utilizado como principal agente quimioterápico para tratar gliomas e essa droga tem sido testada em vários ensaios clínicos para tratamento de melanoma metastático (Middleton et al., 2000). Assim, nos perguntamos se GSH também pode ser importante no processo de resistência a TMZ também em melanomas e se BSO e/ou EZA podem contribuir para sensibilizar esse tipo de tumor ao TMZ. Para responder a essa questão utilizamos 3 linhagens de melanoma humano (SK MEL 28, SK MEL 94 e SK MEL 215) que foram tratadas com doses crescentes de TMZ como agente simples ou em combinação com BSO ou EZA. A viabilidade celular foi avaliada 3 dias depois pelo ensaio de XTT. Constatamos que em todas as linhagens testadas tanto BSO quanto EZA foi capaz diminuir sensivelmente a sobrevivência celular quando comparado com os dados de sobrevivência em células tratadas somente com TMZ (**Figura 38A-C**)

Figura 38. Sensibilidade das linhagens de melanoma humano ao tratamento com TMZ, BSO e EZA. A-B) Perfil de viabilidade celular de linhagens de melanoma humano (SK MEL 28, SK MEL 94 e SK MEL 215) pré-tratadas com BSO (100 μ M) ou EZA (5 μ M) por 16 h e em seguida tratadas com doses crescentes de TMZ. 3 dias após o tratamento com TMZ foi realizado ensaio de XTT, que foi realizado em triplicata. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

Nós testamos também o efeito da combinação de TMZ e BSO ou TMZ e EZA sobrevida da linhagem de melanoma murino B16. E também nessa linhagem observamos o efeito potencializador da combinação entre drogas em relação ao tratamento com TMZ como um agente simples (**Figura 39**). Esses dados em conjunto indicam que GSH também tem papel relevante de promover quimiorresistência a TMZ em linhagens de melanoma *in vitro*.

Figura 39. Sensibilidade da linhagem de melanoma murino B16 ao tratamento com TMZ, BSO e EZA. Perfil de viabilidade celular de linhagens de melanoma murino (B16) pré-tratadas com BSO (100 μ M) ou EZA (5 μ M) por 16 h e em seguida tratadas com doses crescentes de TMZ. 3 dias após

o tratamento com TMZ foi realizado ensaio de XTT, que foi realizado em triplicata. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

5.3.11 Inibição da progressão tumoral após tratamento com TMZ e BSO em modelo de melanoma murino

Em seguida, testamos se esse efeito sinérgico, obtido com a combinação de TMZ e BSO, também pode atuar em sistema mais complexo, *in vivo*. Para tanto, inoculamos $2,5 \times 10^5$ células B16 no flanco de camundongos C57Bl/6 e dividimos os animais em 4 grupos experimentais (n=5): 1) PBS; 2) BSO (450 mg/kg); 3) TMZ (30 mg/kg); 4) TMZ + BSO. 6 dias após a inoculação das células tumorais, iniciamos o tratamento por 3 dias, seguido por intervalo de 2 dias e mais 2 dias de tratamento.

Essa linhagem tumoral é bem conhecida pela seu alto poder proliferativo e de resistência a quimioterápicos (Ortega et al., 2003). De fato, verificamos que 6 dias após inoculação das células já ocorre o aparecimento de tumores mensuráveis. E 15 dias após a inoculação os animais foram sacrificados, uma vez que o volume tumoral atingiu cerca de 2000 mm^3 . De fato, houve um crescimento do tumor em torno de 70 vezes em relação ao tamanho (volume) inicial no grupo controle (PBS e BSO) em intervalo de 9 dias (**Figura 40A**). Já no grupo tratado com TMZ o crescimento tumoral foi menos, porém ainda marcante, cerca de 40 vezes, e no grupo que foi submetido a tratamento combinatório entre TMZ e BSO houve um aumento do volume tumoral de cerca de 10 vezes em relação aos volume iniciais. Desta forma, TMZ em combinação com BSO provocou maior inibição significativa na progressão tumoral de melanoma murino quando comparado ao tratamento com TMZ sozinho (**Figura 40A-B**).

A **B**

Figura 40. Efeito na progressão tumoral de melanoma murino após tratamento com TMZ e BSO. **A)** Animais C57Bl/6 foram inoculados com $2,5 \times 10^5$ células B16 e após 6 dias foram tratados com BSO (450 mg/kg) 5 h antes de receber injeção peritoneal com 30 mg/kg de TMZ. O regime de tratamento está indicado pela setas vermelhas (3 dias de tratamento, 2 dias de intervalo e mais 2 dias de tratamento). Cada grupo era constituído por 5 animais; **B)** Imagem representativa dos animais no 9º dia após início do tratamento.

5.3. Discussão

Durante as últimas 2 décadas o agente alquilante TMZ tem recebido crescente atenção em especial devido a seu efeito terapêutico contra gliomas. De fato, desde o trabalho de Stupp e colaboradores, TMZ tem sido usado como o tratamento padrão para pacientes com gliomas (Stupp et al., 2005).

O primeiro agente quimioterápico usado para tratar melanoma foi aprovado para uso há mais de 30 anos e esse composto ainda é considerado como droga referência, apesar de que respostas completas ocorrerem em apenas 10% dos casos (Flaherty, 2010; Luke, Schwartz, 2013). DTIC é administrado por via intravenosa, necessita de ativação metabólica e é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Assim sendo, essa droga é ineficaz contra metástase cerebral, que ocorre em cerca de 2/3 dos pacientes com melanoma metastático. Metástase cerebral influencia negativamente o prognóstico de melanoma, sendo que pacientes tem uma sobrevida média de aproximadamente 4 meses após o diagnóstico (Fonkem et al., 2012).

Estudo clínico de fase III em que comparou DTIC com TMZ no tratamento de melanoma metastático reportou que houve impacto equivalente na sobrevida utilizando DTIC ou TMZ, mas houve melhora da qualidade de vida do paciente nos pacientes que receberam TMZ (Middleton et al., 2000). Assim, para o tratamento de melanomas metastático TMZ tem se mostrado como uma alternativa terapêutica válida (Luke, Schwartz, 2013; Quirbt et al., 2007).

TMZ tem como alvo o DNA e é capaz de induzir mais de 10 produtos de metilação de bases diferentes. Sendo que há uma concordância entre pesquisadores que a lesão O₆-meG é a lesão mais citotóxica. O₆-meG pode ser reparado diretamente pela enzima MGMT pela transferência do grupo metil do oxigênio da guanina para o resíduo de cisteína na posição 145 do sítio ativo de MGMT, em seguida a enzima sofre ubiquitinação e é degradada via proteossomo. Na presença do seu inibidor O₆-benzilguanina, MGMT é ubiquitinado o que induz a sua degradação uma vez que há a transferência de um grupamento benzil do 6BG para o mesmo resíduo de cisteína do sítio ativo de MGMT (Kaina et al., 2007).

Deficiências na via de MMR, especialmente em genes *MLH1* e *MSH2*, levam a predisposição do câncer de cólon não poliposo hereditário (Poulogiannis et al., 2010). A principal função do sistema de MMR é verificar a recém sintetizada fita de DNA e remover bases mal pareadas que foram geradas durante a replicação. Dados experimentais indicam

que deficiências a via de MMR levam a resistência a grande gama de quimioterápicos. É possível que o reconhecimento do dano no DNA pelo sistema de MMR pode desencadear o processo apoptótico ou que o ciclo fútil de reparo de bases lesionadas e mal pareamento destas gere quebras da fita do DNA. Além disso, como vimos, o sistema de reparo da via de BER também tem papel importante na resistência a TMZ.

Mas devido ao baixo sucesso terapêutico do TMZ contra glioma e melanoma, outros fatores devem estar garantindo a quimiorresistência nesses tumores.

Tumores encaram dois grandes desafios metabólicos: como prover a grande demanda energética devido a alta taxa de proliferação celular e como sobreviver a flutuações ambientais como disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Células tumorais alteram dramaticamente o seu circuito metabólico o que parece resultar diretamente de mutações selecionadas durante o processo tumorigênico. Otto Warburg observou que células tumorais frequentemente utilizam intensamente glicólise em detrimento da respiração mitocondrial (Warburg et al., 1927). Um tema emergente na biologia do câncer é que muitos genes que podem iniciar a tumorigênese estão intrinsecamente ligados a regulação metabólica. Por sua vez, um grande número de genes supressores de tumor tem papel crítico na inibição de crescimento e proliferação quando suplementos intracelulares de metabólitos essenciais tornam-se limitados (Jones, Thompson, 2009). No contexto de metabolismo celular, é agora aparente que células tumorais adaptam-se ao estresse redox criado pelo rápido crescimento celular, limitação de nutrientes e oxigênio, pelo desenvolvimento de reações metabólicas alternativas que garantem que elas sejam insensíveis a outros fatores de estresse como quimioterapia e radiação.

ROS são definidos como espécies químicas contendo oxigênio com propriedades reativas. Essas espécies incluem ânion superóxido, radical hidroxila e H_2O_2 . Essas espécies químicas são derivadas de moléculas de oxigênio que são consumidas em várias reações metabólicas, que ocorrem principalmente na mitocôndria. De fato, estima-se que cerca de 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria seja reduzido para formar ânion superóxido, assim a mitocôndria é considerada a principal fonte de ROS da célula (Handy, Loscalzo, 2011). Em níveis baixos a moderados, ROS agem como moléculas sinalizadoras que estão envolvidas em diversos processos celulares como proliferação e diferenciação (Janssen-Heininger et al., 2008). Entretanto, em excesso ROS podem reagir e causar modificações em vários componentes biológicos como DNA, proteínas e lipídeos. Assim uma forte regulação tanto da produção quanto da detoxificação de ROS é necessária.

De fato, a regulação da homeostase redox é fundamental para a manutenção do

funcionamento normal celular e para assegurar a sobrevivência celular. As células cancerígenas são caracterizadas por terem altos níveis de estresse oxidativo (Cairns et al., 2011). Esse estresse oxidativo é devido ao acúmulo de ROS gerado pelo desbalanço entre a sua geração e eliminação. Os altos níveis de ROS em células tumorais são uma consequência de alterações em várias vias de sinalização que afetam o metabolismo celular. Esses ROS são contra atacados pela elevada quantidade de mecanismos de defesa antioxidante presentes em células tumorais (Diehn et al., 2009).

Como altos níveis de ROS são deletérios para as células, estresse oxidativo pode ser usado para combater o câncer. Os altos níveis de ROS causam pressão para que células tumorais adaptem-se ao ambiente hostil e uma das principais vias é pelo desenvolvimento de poderosos mecanismos antioxidantes. Mas apesar de ter melhor sistema antioxidante, células tumorais mantem os níveis de ROS mais altos do que os encontrados em células normais (Trachootham et al., 2009). Esse aspecto oferece uma interessante janela terapêutica para que células tumorais possam ser sensibilizadas em maior grau do que as normais à agentes que induzam ou promovam maior formação de ROS.

Várias drogas antineoplásicas que são utilizadas na clínica induzem altos níveis de estresse oxidativo (Conklin, 2004). Por exemplo, drogas como taxanos (paclitaxel e doxetaxel), vinca alcalóides (vincristina e vimblastina) e anti-metabólitos (5-FU e metotrexato) promovem a liberação do citocromo c e interferem na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial resultando na geração de ânion superóxido (Conklin, 2004). Além disso, quimioterápicos podem reagir com lipídeos, proteínas e DNA, que por sua vez também podem gerar outros radicais na célula.

Zhang e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que TMZ induz a formação de ROS (Zhang et al., 2010). Assim, utilizando a linhagem celular de glioma U87MG, os autores demonstraram que após 2 h de tratamento com 250 μ M de TMZ havia aumento de pelo menos 2 vezes na geração de ROS em relação ao controle, efeito que foi revertido quando as células foram incubadas com NAC. Mais importante, NAC também foi capaz de inibir a morte celular induzida por TMZ (Zhang et al., 2010). Resultados similares foram reportados nesta tese. Mostramos que a geração de ROS pelo TMZ é completamente inibida quando adicionamos NAC ao meio de cultura celular e que esse antioxidante é capaz de proteger as células do efeito citotóxico de TMZ. Depletamos os níveis de GSH com BSO observamos uma pronunciado aumento de geração de ROS, maior quantidade de lesões oxidativas no DNA genômico e, conseqüentemente, maior indução de morte celular após tratamento com TMZ.

Logo em seguida a este trabalho, Oliva e colaboradores mostraram que o metabolismo mitocondrial tem papel central na quimiorresistência a TMZ em gliomas. Nesse trabalho, uma linhagem, derivada de U251MG, resistente a TMZ foi estabelecida através do tratamento com doses baixas da droga por um longo período (batizada de UTMZ). A linhagem UTMZ mostrou maior eficiência no acoplamento mitocondrial, o que por sua vez gerou menor níveis de ROS. Os autores também observaram uma diferença expressiva na geração de ROS após tratamento com TMZ entre a células U251MG e UTMZ, sendo que nesta última a geração de ROS foi 10 vezes menor do que os níveis apresentados pela linhagem parental. Além disso, células UTMZ apresentaram níveis mais elevados de GSH e, interferindo no balanço redox celular utilizando BSO ou NAC, pode-se modular a morte celular provocada por TMZ (Oliva et al., 2011).

Mais recentemente, foi demonstrado que doses utilizadas na clínica de TMZ provocam grandes quantidades de danos no DNA mitocondrial. Wang e colaboradores foram os primeiros a demonstrar lesão no DNA mitocondrial induzido por TMZ (Wang et al., 2013). Utilizando modelo de células precursoras mielóides humanas e verificou-se que os níveis de danos no DNA mitocondrial após tratamento com TMZ, é dose dependente e correlacionava com a indução de morte celular.

O mesmo grupo verificou anteriormente que a enzima de reparo MGMT não contém sinal de localização mitocondrial e além disso, em experimentos com microscopia confocal em células marcadas contra MGMT não foi possível a visualização desta enzima na mitocôndria (Cai et al., 2005). Sugerindo que essa proteína não está presente na mitocôndria. Esse achado tem grande implicação na resposta a TMZ, uma vez que essa droga causa metilação no DNA mitocondrial como visto no trabalho de Wang e colaboradores (Wang et al., 2013) e a ausência da principal enzima responsável pela remoção direta da lesão O6-meG (considerada a mais deletéria para a célula) pode contribuir para o efeito tóxico para essa organela o que por sua vez pode ter um grande impacto na toxicidade celular via aumento de ROS.

De fato, Cai e colaboradores mostraram que a indução do direcionamento de MGMT para a mitocôndria, através da fusão do sinal de localização mitocondrial à MGMT, resultou na resistência a agentes alquilantes, incluindo o TMZ, em células progenitoras hematopoiéticas e na linhagem tumoral K562 (Cai et al., 2005). Diante disso, os autores especulam que o dano no DNA mitocondrial e no genômico possa contribuir igualmente para a indução de morte celular por TMZ.

Uma vez que o TMZ é capaz de causar metilação do DNA mitocondrial, provocando

uma maior produção de ROS, GSH poderia atuar como agente antioxidante mitigando o estresse oxidativo provocado pelo mau funcionamento mitocondrial ou por outro lado, GSH pode estar atuando pelo mecanismo de detoxificação através da ligação covalentemente com o TMZ, de forma semelhante ao observado com GSH e cisplatina.

Apesar de tratamentos como quimioterapia e radioterapia (que induzem a produção de ROS) serem úteis na eliminação de grande parte da massa tumoral, esses tipos de abordagens podem fracassar em alcançar a cura de pacientes devido a grande habilidade de algumas sub-populações celulares tumorais, como as CSC, sobreviverem em condições de alta concentração de ROS pela superexpressão de agentes antioxidantes. Uma vez que ROS são mediadores centrais dos efeitos letais da radiação ionizante e de alguns quimioterápicos, CSC ou sub-populações com alta capacidade antioxidante podem ter vantagem proliferativa e além disso ROS podem induzir mutações no DNA de outras células levando ao desenvolvimento de resistência ao tratamento.

Existem vários reguladores, tanto positivos quanto negativos, que tem impacto significativo na expressão de genes antioxidantes. É essencial compreender as vias específicas em que atuam esses reguladores antes de se traçar uma estratégia terapêutica de modulação dos níveis de ROS. Como vimos anteriormente, o fator de transcrição NRF2 possui papel crucial no comando da resposta antioxidante celular, através da indução de ampla gama de genes envolvidos na neutralização e/ou detoxificação de ROS e consequentemente promovendo a proteção celular.

Foi demonstrado que a alta expressão de NRF2 está associada a resistência a cisplatina, doxorrubicina e etoposídeo em linhagens de câncer de pulmão e de mama (Wang et al., 2008b). Consistente com esses dados, a superexpressão ou o silenciamento de Nrf2 em linhagens tumorais foi capaz de conferir resistência ou sensibilizar, respectivamente, ao tratamento com antineoplásicos (Homma et al., 2009; Lister et al., 2011). Estudos utilizando camundongos deficientes em Nrf2 mostraram o papel crucial desse fator de transcrição na proteção contra agentes que danificam o DNA, uma vez que observou-se que esses animais apresentam maior formação de adutos de DNA e são sensíveis a drogas antitumorais (Aoki et al., 2001; Ramos-Gomez et al., 2003).

Foi demonstrado que células que desenvolveram resistência a agentes quimioterápicos pode ocorrer superexpressão de Nrf2. Por exemplo, células de câncer de ovário resistentes a doxorrubicina apresentam elevados níveis de Nrf2 comparado com células selvagens, e o silenciamento de Nrf2 restaurou a sensibilidade à droga na linhagem resistente (Shim et al., 2009). Modelo *in vivo* de câncer de pulmão com Nrf2 silenciado foi

mais sensível a carboplatina do que tumor controle (Singh et al., 2008).

Apesar da frequência de mutações em KEAP1 ou NRF2 ser relativamente baixa, outros mecanismos que desregulam a expressão desses genes — como hipermetilação dos promotores de KEAP1 ou NRF2 — já foram descritos em vários tumores (Wang et al., 2008a; Yu et al., 2010). Clinicamente, foi observado que diminuição da expressão de KEAP1 ou o aumento da expressão de NRF2 estava associado com pior prognóstico, com significativa diminuição na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão 5 anos após o diagnóstico (Merikallio et al., 2012; Solis et al., 2010). Observações semelhantes foram feitas num estudo com pacientes com câncer de ovário, sendo observado que há superexpressão de NRF2 em 50% dos casos devido a mutações em KEAP1, resultando em resistência ao tratamento com cisplatina, resultando em uma menor sobrevida dos pacientes (Konstantinopoulos et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que, em linhagens celulares de melanoma humano a superexpressão e o silenciamento de NRF2 levava a resistência e sensibilização a cisplatina e DTIC, respectivamente (Miura et al., 2014). E mais importante, com a análise de amostras tumores de melanoma verificou-se a presença de mutações somáticas em KEAP1, acarretando maior disponibilidade de NRF2, e maior expressão dessa proteína correlaciona com baixa resposta ao tratamento (Miura et al., 2014).

Poucos estudos foram realizados para avaliar o papel de NRF2 na promoção de resistência a quimioterápicos no modelo tumoral de gliomas. Estudo recente relatou que a superexpressão de NRF2 em células U87MG foi capaz de promover proteção contra o indução de morte por ACNU (Sukumari-Ramesh et al., 2015). Em outro trabalho, foi observado em amostras de gliomas primários e recorrentes há indução de NRF2 após tratamento com TMZ e radiação ionizante. Dados similares foram obtidos para células U251MG e, mais importante, o silenciamento de NRF2 foi capaz de sensibilizar essa linhagem ao tratamento com TMZ em combinação com irradiação ionizante (Cong et al., 2014).

Em 2013 uma série de trabalhos do mesmo grupo de pesquisa, utilizando a linhagem U251MG como modelo, mostrou que após silenciamento de NRF2 havia aumento do processo autofágico com a potencialização da morte celular induzido por TMZ (Zhou et al., 2013b). Além disso, foi demonstrado que o silenciamento de NRF2 resultava em menor potencial de invasão e de migração devido principalmente a menor indução da metaloproteinase de matriz 9 (Pan et al., 2013). A diminuição dos níveis de NRF2 também inibe a proliferação celular *in vitro* e no modelo xenográfico foi mostrado que ocorre significativa diminuição da densidade de vascularização, aumento da ativação da caspase 3 e

diminuição da marcação com ki67 (marcador de proliferação celular) em relação a célula U251MG (Ji et al., 2013).

A ação de NRF2 pode estar conferindo resistência por diversos mecanismos: i) através da supressão do estresse oxidativo que pode ter papel importante no efeito citotóxico de um quimioterápico; ii) através da detoxificação da droga pela GSH; iii) através da indução de bombas de efluxo dependentes de ATP, como a MDR1, diminuindo a eficiência da droga.

O metabolismo de GSH está ativamente envolvido na proteção de células tumorais contra apoptose, uma vez que está associado a resistência a drogas antitumorais como compostos de platina, antraciclinas e agentes alquilantes. Como vimos anteriormente no Capítulo 2, o tripetídeo GSH é o mais abundante e efetivo componente do sistema de defesa celular contra radicais livres. GSH tem importante papel na manutenção do balanço redox intracelular pela sua ação de neutralização de radicais livres. A síntese de GSH é realizada no pela ação da c-glutamilcisteína (GCL) e GSH sintetase. GCL é um heterodímero compreendido de uma subunidade catalítica (GCLC) e uma subunidade regulatória (GCLM).

Assim, estratégias terapêuticas que modulam os níveis de GSH são alternativas tentadoras. Comparado com células normais, células tumorais contam com maiores níveis de GSH e mostraram-se mais sensíveis a drogas que afetam o metabolismo de GSH. BSO é um inibidor seletivo e irreversível de GCL, sendo que administração de BSO é capaz de diminuir os níveis de GSH em 90% em vários tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* (Griffith, 1982).

Além do BSO, existem várias drogas que interferem no metabolismo de GSH, entre elas o ezatiostat que é inibidor específico de GST π . Ezatiostat tem sido utilizado em testes clínicos para o tratamento de pacientes com síndrome mielodisplásica, doença da medula óssea caracterizada pela produção exacerbada de células sanguíneas e alto risco de transformação em leucemia mielóide aguda. Estudos clínico de fase I e II mostrou que a droga é bem tolerada e de fato provoca inibição de crescimento nas células sanguíneas (Raza et al., 2012; Raza et al., 2009).

Foi observado que na linhagem de melanoma humano G3361 resistente a cisplatina ou BCNU há a expressão de 3 a 5 vezes maior de GST π do que os níveis verificados na célula controle (Wang et al., 1989). Recentemente, observou-se que utilizando um outro inibidor de GST π , o NBDHEX, houve aumento da morte celular provocado por TMZ em células de melanoma, com efeito significativo na diminuição do crescimento tumoral *in vivo*

(Tentori et al., 2014). Indicando que a atividade dessa enzima tem relevante papel na resistência também para TMZ em melanoma.

Foi demonstrado em células de astrocitomas GSH é capaz de ligar-se com BCNU via GST π e que isso leva a uma menor quantidade de dano no DNA e maior resistência a esse quimioterápico (Ali-Osman et al., 1989). Em estudo com tumores de pacientes com diferentes graus de glioma identificou maior expressão de GST π quando comparado com o tecido normal e, ainda, maior expressão dessa proteína em gliomas de grau elevado comparado com gliomas de grau baixo (Calatuzzolo et al., 2005). Outro trabalho mostrou que a maior expressão de GST π correlaciona fortemente com a maior agressividade do tumor e que por isso pacientes com tumores de glioma com alta expressão de GST π apresentaram pior prognóstico (Ali-Osman et al., 1997).

No presente trabalho nos debruçamos sobre o papel de GSH na resistência a TMZ. Assim, utilizando linhagens de glioma humanos observamos aumento da geração de ROS após tratamento com TMZ, e que essa droga induz também a produção de elementos celulares contendo tióis. E demonstramos que a combinação de BSO e TMZ gera maior formação de ROS do que os níveis gerados pelas drogas isoladamente. Como consequência, a combinação entre BSO e TMZ induziu maior geração de danos no DNA e mais importante, com o resultado do ensaio do cometa com FPG, demonstramos que há maior indução de danos especificamente relacionados a ROS. Além disso, verificamos que a depleção ou aumento dos níveis de GSH pela adição de BSO ou NAC no meio de cultura aumenta a indução de morte ou protege as células contra os efeitos de TMZ, respectivamente. Esses resultados sugerem fortemente que GSH tem papel decisivo na resistência a TMZ.

Demonstramos ainda que o fator de transcrição NRF2 é central na mediação da resistência a TMZ, uma vez que mostramos que o silenciamento de NRF2 potencializou fortemente a citotoxicidade desse agente quimioterápico. De fato, demonstramos que em células silenciadas para esse gene tratadas com TMZ em comparação com células controle, há maior indução de danos no DNA (analisado pela marcação de γ H2AX), maior indução de apoptose (analisado pela marcação de caspase 3 ativada e também pela população em sub-G1) e menor sobrevivência (dado pelo ensaio de XTT). Importante destacar que nessas células houve significativa diminuição dos níveis de tióis intracelulares, indicando que houve diminuição dos níveis de GSH. Esse dado sugere que a concentração de GSH dentro da célula é crucial na determinação da resistência a TMZ e também que o fator que regula a disponibilidade de GSH é o NRF2.

Enquanto que o regime quimioterápico é comumente utilizado como parte do tratamento desses tumores, o que pode trazer benefícios por um curto período de tempo, a responsividade do tumor à quimioterapia é eventualmente impedida pelo desenvolvimento de resistência, sendo essa a principal causa do aparecimento de recidivas.

Gliomas e melanomas metastáticos são tumores extremamente agressivos e pacientes com esses tipos de tumores têm um prognóstico sombrio. Outra grande semelhança entre melanomas e gliomas, é que no tratamento quimioterápico tem como principais agentes o TMZ ou seu análogo DTIC. Dessa forma, protocolos clínicos que visem a potencialização do efeito citotóxico em gliomas também poderiam em teoria serem aplicados a pacientes com melanoma. Com isso em mente resolvemos testar linhagens de melanoma humano com a combinação TMZ e BSO e avaliar o possível efeito sinérgico entre essas drogas. Assim, utilizando linhagens de melanoma humanos (SK MEL 28, SK MEL94 e SK MEL 215) verificamos que de fato a depleção da GSH através da incubação com BSO potencializou a morte celular induzida pelo TMZ. Assim como a inibição da atividade de GST π pela incubação com ezatiostat foi capaz de aumentar a morte celular induzida por TMZ.

Num estudo comparando B16 (F10) e B16 (F1) foi demonstrado que a primeira contava maiores níveis de GSH, Bcl-2 e tinha maior potencial metastático do que B16 (F1). Os autores demonstraram que a combinação de depleção de GSH (utilizando BSO) e silenciamento de Bcl-2 era capaz de abolir a habilidade de metástase de B16 (F10) no modelo *in vivo* (Ortega et al., 2003).

Utilizando modelo tumoral de melanoma através a inoculação da linhagem celular B16 (F10) em camundongos C57Bl/6, verificamos que a combinação de BSO e TMZ foi capaz de diminuir de forma significativa a progressão tumoral em relação ao efeito inibitório observado quando somente TMZ foi administrado. Esses dados mostram claramente o papel decisivo de GSH em conferir resistência a TMZ, que esse fenômeno não está restrito a um tipo de tumor e que conseguimos reproduzir os resultados *in vitro* no modelo mais complexo, agora *in vivo*.

Além disso, com a utilização do inibidor de GST π , ezatiostat, verificamos que essa enzima tem papel importante na resistência a TMZ, uma vez que observamos maior morte celular em células incubadas com TMZ em combinação com esse inibidor. Verificamos o efeito potencializador da morte celular de BSO e EZA em combinação com TMZ não só em células de gliomas mas também em células de melanoma humanos e também murino (B16) *in vitro*. Esses dados indicam que GSH pode estar se ligando a moléculas de TMZ via atividade da GST π , de forma semelhante ao que acontece com cisplatina.

Mas é importante deixar claro que seja qual for o mecanismo pelo qual GSH está regulando a resposta celular frente ao tratamento com TMZ, se é via atividade de GST provocando a detoxificação da droga ou pelo efeito antioxidante de GSH, diminuindo os efeitos deletérios das ROS gerados por TMZ, se houver depleção da GSH essas duas possíveis vias serão eliminadas de uma vez só. Em outras palavras, a utilização de BSO é capaz de inibir a citoproteção (seja via atividade antioxidante ou detoxificadora) de GSH.

Em conjuntos esses resultados indicam o papel determinante do NRF2 na mediação da resistência tumoral a TMZ via indução da síntese e utilização de GSH. E notavelmente, através da depleção dos níveis de GSH foi possível reverter o quadro de resistência. Desta forma, propomos que NRF2 como um marcador de resistência tumoral em gliomas e melanomas, como também a utilização de BSO em combinação com TMZ como regime quimioterápico no tratamento de pacientes com esses tumores (**Figura 41**).

Figura 41. Modelo proposto do papel de NRF2 na resistência a TMZ. TMZ causa metilação do DNA genômico e do DNA mitocondrial. A lesão neste último pode prejudicar o funcionamento da mitocôndria, gerando grande quantidade de ROS provocando estresse oxidativo, que por sua vez ativa NRF2. Esse fator de transcrição aumenta a expressão de genes relacionados a síntese e utilização de GSH que por sua vez pode agir como agente antioxidante, neutralizando os ROS consequentes do tratamento com TMZ e/ou pode agir como agente detoxificante, ligando-se ao TMZ e eliminando-o da célula. Assim o aumento do GSH via indução por NRF2 confere resistência a TMZ. Propomos o uso do inibidor da síntese da GSH, BSO, em combinação com TMZ para reverter a resistência a esse quimioterápico.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

GSH é um peptídeo de baixo peso molecular altamente abundante nas células e é conhecido pelo seu papel crucial na manutenção do balanço oxidativo celular uma vez que age como sequestrador de radicais livres, que as células produzem naturalmente. Além disso, GSH tem um papel protetor contra agentes xenobióticos já que o seu altamente reativo grupamento tiol liga-se e interage com esses agentes.

Uma vez que células tumorais em geral têm maior capacidade antioxidante do que células normais, acreditamos que uma estratégia importante na clínica seria eliminar essa defesa tão importante contra quimioterápicos. De forma particular, seria de grande valia depletar os níveis de GSH em regime de tratamento combinado com cisplatina e/ou TMZ uma vez que esse peptídeo tem dois papéis cruciais: poderoso agente antioxidante e eficaz agente detoxificador.

Nessa tese ficou evidenciado o papel central de GSH como agente determinante de resistência tanto para cisplatina quanto para TMZ além disso esse mecanismo de resistência mostrou-se importante em dois modelos tumorais bem distintos (glioma e melanoma) mas que compartilham um prognóstico clínico sombrio.

Na primeira parte da tese, mostramos que a linhagem de glioma humano U138MG (p53 mutado) é mais resistente que U87MG (p53 selvagem) após tratamento com cisplatina, por outro lado, experimentos utilizando outras linhagens de glioma com p53 selvagem ou mutado observou-se sensibilidade muito similar as verificadas em U87MG. Curiosamente, utilizando o ensaio de HCR com plasmídeos tratados com cisplatina, todas as linhagens de glioma testadas apresentavam capacidade semelhante de reparar adutos de cisplatina no DNA plasmidial. Além disso, verificou-se que a linhagem U138MG apresentou menos adutos de cisplatina no seu material genético, menor indução de quebras duplas nas fitas do DNA e maior concentração de GSH. Esses resultados indicam que nas células U138MG são mais resistentes a cisplatina pelo menor número de lesões havendo assim uma menor sinalização para a morte.

Esses resultados sugerem que o papel de p53 na resposta a cisplatina é complexa e que o status de p53 não se configura como um bom marcador da predição da resposta celular frente ao tratamento com cisplatina. Por outro lado, alterações nos níveis de algumas proteínas relacionadas ao processo ciclo celular, ao processo de reparo de DNA ou

GSH são importantes na tumorigênese por induzir o fenótipo de quimiorresistência de células malignas. Entretanto, utilizando estratégias inovadoras, através da utilização de inibidores farmacológicos da glutathione sintetase, é possível sensibilizar células que contam com intrincados mecanismos de resistência, uma vez que dificilmente terão capacidade de lidar com a enorme quantidade de lesões cisplatina-DNA quando utiliza-se BSO associado ao quimioterápico.

Assim, a sensibilidade à cisplatina não está intimamente relacionada com o status de p53 ou à capacidade de reparo de adutos de cisplatina e outros fatores de resistência, como a disponibilidade de glutathione, possuem um papel decisivo no desencadeamento da morte celular. Nesse sentido, propomos a concentração de glutathione intracelular como um potencial marcador molecular de resistência a cisplatina em glioma. Dessa forma, diminuição dos níveis de GSH utilizado BSO em associação com cisplatina e TMZ configura-se como uma alternativa promissora para o tratamento desse tipo de tumor tão devastador.

Os gliomas e melanomas mesmo que inicialmente responsivos tendem a recidir, daí a importância de se ampliar o conhecimento de como o TMZ induz morte celular e principalmente quais os possíveis mecanismos de resistência que a célula conta para evadir a morte. Como vimos, glioma e melanoma compartilham várias características: baixo sucesso terapêutico, alta mortalidade e prognóstico extremamente ruim. Além disso, a principal foco metastático de melanoma é o cérebro. Assim TMZ apresenta-se como agente terapêutico importante também para melanoma e desvendar os mecanismos de resistência a esse quimioterápico nesses tipos celulares é crucial para a eficácia do tratamento.

Na segunda parte da tese demonstramos que GSH tem papel determinante na resistência a TMZ tanto em glioma quanto em melanoma. Primeiro, utilizando linhagens celulares de glioma humano mostramos que GSH é regulado pelo fator de transcrição NRF2 uma vez que NRF2 é capaz de induzir a expressão de genes envolvidos na síntese e utilização de GSH. Vimos que num mecanismo de defesa celular após o tratamento com TMZ ocorre a indução de NRF2 bem como dos seus alvos resultando no aumento dos níveis de tióis. Também verificamos que o silenciamento de NRF2 é capaz de sensibilizar essas linhagens ao tratamento com TMZ. Além disso, utilizando tanto linhagens de glioma quanto de linhagens de melanoma murino e humano, mostramos que a inibição da síntese (BSO) ou a inibição da atividade de GST π (ezatiostat) potencializa a morte celular induzida por TMZ. Notavelmente, verificamos efeito sinérgico entre BSO e TMZ em modelo de melanoma *in*

vivo.

BSO foi testado em estudos clínicos em que foi mostrado que essa droga tem boa biodisponibilidade, é capaz de diminuir drasticamente os níveis celulares de GSH e é bem tolerada pelos pacientes. Entretanto, até o presente momento esses estudos foram realizados somente em combinação com a droga alquilante melfalan e nenhum teste clínico foi conduzido para avaliar o possível efeito potencializador entre BSO e cisplatina e/ou TMZ.

O fato de que tanto a cisplatina quanto o TMZ já serem utilizados no tratamento antitumoral contra glioma facilita grandemente a implementação de novos protocolos clínicos agora com a combinação de BSO, cisplatina e TMZ. Assim, acreditamos que o regime terapêutico com BSO em combinação com cisplatina e/ou TMZ tem real potencial de ser aplicado na clínica.

Para concluir, com essa tese acreditamos ter contribuído para que houvesse uma ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos de resistência a dois importantes quimioterápicos, mas, principalmente, esperamos que esses achados possam de fato contribuir para formular novas estratégias terapêuticas para os pacientes com gliomas e melanomas.

REFERÊNCIAS*

- Agarwala SS, Eggermont AMM, O'Day S, Zager JS. Metastatic melanoma to the liver: A contemporary and comprehensive review of surgical, systemic, and regional therapeutic options. *Cancer*. 2014;120(6):781–9.
- Agnihotri S, Gajadhar AS, Ternamian C, Gorlia T, Diefes KL, Mischel PS, et al. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):253–66.
- Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, O'Connor MJ. A Role for Polymerase η in the Cellular Tolerance to Cisplatin-Induced Damage. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9799–806.
- Ali-Osman F, Brunner JM, Kutluk TM, Hess K. Prognostic significance of glutathione S-transferase pi expression and subcellular localization in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec 1;3(12):2253–61.
- Ali-Osman F, Caughlan J, Gray GS. Decreased DNA Interstrand Cross-Linking and Cytotoxicity Induced in Human Brain Tumor Cells by 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea after in Vitro Reaction with Glutathione. *Cancer Res*. 1989 Nov 1;49(21):5954–8.
- Aloyz R, Xu Z-Y, Bello V, Bergeron J, Han F-Y, Yan Y, et al. Regulation of Cisplatin Resistance and Homologous Recombinational Repair by the TFIIH Subunit XPD. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5457–62.
- Anderson CP, Matthay KK, Perentesis JP, Neglia JP, Bailey HH, Villablanca JG, et al. Pilot study of intravenous melphalan combined with continuous infusion L-S,R-buthionine sulfoximine for children with recurrent neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(10):1739–46.
- Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, Itoh K, Yamamoto M. Accelerated DNA Adduct Formation in the Lung of the Nrf2 Knockout Mouse Exposed to Diesel Exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Jun 15;173(3):154–60.
- Bailey H, Ripple G, DT K, ZA R, Alberti D, Feierabend C, et al. Phase I Study of Continuous-Infusion L-S,R-Buthionine Sulfoximine With Intravenous Melphalan. *J Natl Cancer Inst*. 1997;1790–8.

* De acordo com:

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

Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased Expression of P-Glycoprotein and Doxorubicin Chemoresistance of Metastatic Breast Cancer Is Regulated by miR-298. *Am J Pathol*. 2012;180(6):2490–503.

Barckhausen C, Roos WP, Naumann SC, Kaina B. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene*. 2013 Apr 22;33(15):1964–74.

Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421–9.

Batista LFZ, Roos WP, Christmann M, Menck CFM, Kaina B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11886–95.

Batista LFZ, Roos WP, Kaina B, Menck CFM. p53 Mutant Human Glioma Cells Are Sensitive to UV-C-Induced Apoptosis Due to Impaired Cyclobutane Pyrimidine Dimer Removal. *Mol Cancer Res*. 2009 Feb 1;7(2):237–46.

Beier D, Schulz J, Beier C. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol Cancer*. 2011;10(1):128.

Van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer*. 2006 Mar;42(5):582–8.

Bernstein KA, Rothstein R. At Loose Ends: Resecting a Double-Strand Break. *Cell*. 2009. p. 807–10.

Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer*. 2012 Sep;12(9):587–98.

Bowman KK, Sicard DM, Ford JM, Hanawalt PC. Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells. *Mol Carcinog*. 2000 Sep 1;29(1):17–24.

Brandes AA, Basso U, Reni M, Vastola F, Tosoni A, Cavallo G, et al. First-Line Chemotherapy With Cisplatin Plus Fractionated Temozolomide in Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Phase II Study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1598–604.

Briles EB, Kornfeld S. Isolation and Metastatic Properties of Detachment Variants of 816 Melanoma Cells. *J Natl Cancer Inst*. 1978 Jun 1;60(6):1217–22.

- Byun S-S, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int.* 2005 May;95(7):1086–90.
- Cai S, Xu Y, Cooper RJ, Ferkowicz MJ, Hartwell JR, Pollok KE, et al. Mitochondrial Targeting of Human O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Protects against Cell Killing by Chemotherapeutic Alkylating Agents. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3319–27.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011 Feb;11(2):85–95.
- Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, Sciacca FL, Pollo B, Cajola L, et al. Expression of Drug Resistance Proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- π in Human Glioma. *J Neurooncol.* 2005;74(2):113–21.
- Calvert P, Yao K-S, Hamilton TC, O'Dwyer PJ. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. *Chem Biol Interact.* 1998 Apr 24;111–112(0):213–24.
- Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavó E, et al. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J.* Oxford, UK; 2003 May 1;22(9):2245–54.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul 1;59(3):527–605.
- Chaney SG, Sancar A. DNA Repair: Enzymatic Mechanisms and Relevance to Drug Response. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Oct 2;88(19):1346–60.
- Chen HHW, Kuo MT. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. *Met Based Drugs.* 2010a Sep 14;20:430939.
- Chen HHW, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs.* 2010b Jan;2010.
- Chen HHW, Yan J-J, Chen W-C, Kuo MT, Lai Y-H, Lai W-W, et al. Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer.* 2012 Feb;75(2):228–34.
- Chen Z, Xu XS, Yang J, Wang G. Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. *Carcinogenesis.* 2003 Jun 1;24(6):1111–21.
- Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006 Mar 17;13(6):994–1002.
- Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, et al. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. Horwitz MS, editor. *PLoS Genet.* 2010 Jan 29;6(1):e1000832.

- Cleaver JE. γ H2Ax: Biomarker of Damage or Functional Participant in DNA Repair “All that Glitters Is not Gold!” *Photochem Photobiol.* 2011;87(6):1230–9.
- Cong Z-X, Wang H-D, Zhou Y, Wang J-W, Pan H, Zhang D-D, et al. Temozolomide and irradiation combined treatment-induced Nrf2 activation increases chemoradiation sensitivity in human glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2014;116(1):41–8.
- Conklin KA. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr Cancer Ther.* 2004 Dec 1;3(4):294–300.
- Cordonnier AM, Fuchs RPP. Replication of damaged DNA: molecular defect in Xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res Repair.* 1999 Oct 22;435(2):111–9.
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo R da S, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 2003 Nov;85(11):1083–99.
- Cummings M, Higginbottom K, McGurk CJ, Wong OG-W, Köberle B, Oliver RTD, et al. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: Role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jul 14;72(2):166–75.
- D’Atri S, Graziani G, Lacal PM, Nisticò V, Gilberti S, Faraoni I, et al. Attenuation of O 6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Activity and mRNA Levels by Cisplatin and Temozolomide in Jurkat Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug 1;294(2):664–71.
- Datta K, Shah P, Srivastava T, Mathur SG, Chattopadhyay P, Sinha S. Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther.* 2004 May 28;11(8):525–31.
- Debatin K-M, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004;23(16):2950–66.
- Deeken JF, Löscher W. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 15;13(6):1663–74.
- DeVita VT, Chu E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* 2008 Nov 1;68(21):8643–53.
- Diasio R, Harris B. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16(4):215–37.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):780–3.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15665–70.

- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000 Dec 15;62(6):649–71.
- Dringen R, Hamprecht B. Glutathione Restoration as Indicator for Cellular Metabolism of Astroglial Cells. *Dev Neurosci.* 1998;20(4-5):401–7.
- Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of Action of and Resistance to Antitubulin Agents: Microtubule Dynamics, Drug Transport, and Cell Death. *J Clin Oncol.* 1999 Mar 1;17(3):1061.
- Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature.* 2008 Feb 28;451(7182):1111–5.
- England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biol.* 2013;34(4):2063–74.
- Fallik D, Borriani F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, et al. Microsatellite Instability Is a Predictive Factor of the Tumor Response to Irinotecan in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5738–44.
- Fan S, El-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, et al. p53 Gene Mutations Are Associated with Decreased Sensitivity of Human Lymphoma Cells to DNA Damaging Agents. *Cancer Res.* 1994 Nov 15;54(22):5824–30.
- Fan S, Smith ML, Rivert DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, et al. Disruption of p53 Function Sensitizes Breast Cancer MCF-7 Cells to Cisplatin and Pentoxifylline. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1649–54.
- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med.* 1948 Jun 3;238(23):787–93.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):917–21.
- Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer.* 2001;93(4):571–6.
- Fekete I, Griffith OW, Schlageter KE, Bigner DD, Friedman HS, Groothuis DR. Rate of Buthionine Sulfoximine Entry into Brain and Xenotransplanted Human Gliomas. *Cancer Res.* 1990 Feb 15;50(4):1251–6.
- Ferry K V, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of *ercc1-xpf*. *Biochem Pharmacol.* 2000 Nov 1;60(9):1305–13.
- Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res.* 1998 Jan 1;4(1):1–6.

- Flaherty KT. Narrative Review: BRAF Opens the Door for Therapeutic Advances in Melanoma. *Ann Intern Med*. 2010 Nov 2;153(9):587–91.
- Fojo T. Cancer, DNA Repair Mechanisms, and Resistance to Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Oct 3;93(19):1434–6.
- Fonkem E, Uhlmann EJ, Floyd SR, Mahadevan A, Kasper E, Eton O, et al. Melanoma brain metastasis: overview of current management and emerging targeted therapies. *Expert Rev Neurother*. 2012 Oct 1;12(10):1207–15.
- Friche E, Danks MK, Schmidt CA, Beck WT. Decreased DNA Topoisomerase II in Daunorubicin-resistant Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Cancer Res*. 1991 Aug 15;51(16):4213–8.
- Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*. 2012 Feb;12(2):104–20.
- Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y. Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells. *Cancer Res*. 2002 Sep 1;62(17):4899–902.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012 Apr 12;31(15):1869–83.
- Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009 Jan;27(1):3–9.
- Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr;4(4):296–307.
- Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1992 Apr 1;89(7):3070–4.
- Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma. *Cancer*. 2007;109(3):455–64.
- Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Dec;12(12):931–47.
- Griffith OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem*. 1982 Nov 25;257(22):13704–12.
- Hall MD, Okabe M, Shen D-W, Liang X-J, Gottesman MM. The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008 Jan 9;48(1):495–535.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

Handy DE, Loscalzo J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Dec 6;16(11):1323–67.

Hanna N, Einhorn LH. Testicular Cancer: A Reflection on 50 Years of Discovery. *J Clin Oncol*. 2014 Oct 1;32(28):3085–92.

Happold C, Roth P, Wick W, Schmidt N, Florea A-M, Silginer M, et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J Neurochem*. 2012;122(2):444–55.

Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 Enhances Sensitivity to Multiple Chemotherapeutic Agents. *Cancer Res*. 1996 Feb 15;56(4):892–8.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997–1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4189–99.

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*. 1957 Mar 30;179(4561):663–6.

Hoebers FJP, Pluim D, Verheij M, Balm AJM, Bartelink H, Schellens JHM, et al. Prediction of treatment outcome by cisplatin-DNA adduct formation in patients with stage III/IV head and neck squamous cell carcinoma, treated by concurrent cisplatin-radiation (RADPLAT). *Int J Cancer*. 2006 Aug 15;119(4):750–6.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366–74.

Hofmann G, Mattern M. Topoisomerase II in multiple drug resistance. *Cytotechnology*. 1993;12(1-3):137–54.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013 Oct;13(10):714–26.

Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, et al. Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3423–32.

Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, Iijima K, Ninomiya J, Uchida K, et al. Prognostic significance of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in breast cancer. *Br J Cancer*. 2002 Feb 13;86(2):222–5.

Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat struct mol biol*. 2010 Jan;17(1):11–6.

Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Oct 29;99(22):14298–302.

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens A-C, et al. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathol*. 1999 Jul 1;9(3):469–79.

Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem*. 1993 Sep 25;268(27):20116–25.

Jacob S, Aguado M, Fallik D, Praz F. The Role of the DNA Mismatch Repair System in the Cytotoxicity of the Topoisomerase Inhibitors Camptothecin and Etoposide to Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6555–62.

Janssen-Heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul 1;45(1):1–17.

Ji X, Chen, S. Z, L. P, H. Z, Y. L, et al. Knockdown of NF-E2-related factor 2 inhibits the proliferation and growth of U251MG human glioma cells in a mouse xenograft model. *Oncol Rep*. 2013;30:157–64.

Johannessen T-CA, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012 May 1;12(5):635–42.

Johnson SW, Swiggard PA, Handel LM, Brennan JM, Godwin AK, Ozols RF, et al. Relationship between Platinum-DNA Adduct Formation and Removal and Cisplatin Cytotoxicity in Cisplatin-sensitive and -resistant Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res*. 1994 Nov 15;54(22):5911–6.

Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009 Mar 1;23(5):537–48.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Aug 1;6(8):1079–99.

Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res*. 1997;381:227–41.

Karnofsky DA. Summary of results obtained with nitrogen mustard in the treatment of neoplastic disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1958;68(3):899–914.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2001 Jul 1;478(1–2):23–43.

Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, et al. Multiple Microtubule Alterations Are Associated with Vinca Alkaloid Resistance in Human Leukemia Cells. *Cancer Res*. 2001 Aug 1;61(15):5803–9.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Aug;7(8):573–84.

Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL, et al. Cisplatin, Radiation, and Adjuvant Hysterectomy Compared with Radiation and Adjuvant Hysterectomy for Bulky Stage IB Cervical Carcinoma. *N Engl J Med*. 1999 Apr 15;340(15):1154–61.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):285–90.

Kirschner K, Melton D. Multiple Roles of the ERCC1-XPF Endonuclease in DNA Repair and Resistance to Anticancer Drugs. *Anticancer Res*. 2010 Sep 1;30(9):3223–32.

Köberle B, Grimaldi KA, Sunters A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JRW. DNA Repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer*. 1997;70(5):551–5.

Köberle B, Masters JRW, Hartley JA, Wood RD. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol*. 1999 Mar 11;9(5):273–8.

Koch D, Hundsberger T, Boor S, Kaina B. Local intracerebral administration of O6-benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. 2007;82(1):85–9.

Kohsaka S, Takahashi K, Wang L, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, et al. Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. *Cancer Lett*. 2014 Sep 13;331(1):68–75.

Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Fountzilas E, Francoeur N, Sanisetty S, Grammatikos AP, et al. Keap1 Mutations and Nrf2 Pathway Activation in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5081–9.

Krumbhaar EB, Krumbhaar HD. The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *J Med Res.* 1919 Sep;40(3):497–508.3.

Kwon H-C, Roh MS, Oh SY, Kim S-H, Kim MC, Kim J-S, et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol.* 2007 Mar 1;18(3):504–9.

Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 2010 Sep;17(9):1373–80.

Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI, Mullenders LHF. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst).* 2011 Jul 15;10(7):743–50.

Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3832–4.

Lee JT, Steelman LS, McCubrey JA. Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation Leads to Multidrug Resistance Protein-1 Expression and Subsequent Chemoresistance in Advanced Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8397–404.

Li L-H, Dong H, Zhao F, Tang J, Chen X, Ding J, et al. The upregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in liver is involved in acquired resistance to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* 2013 May;49(7):1752–60.

Li Q, Gardner K, Zhang L, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E. Cisplatin Induction of ERCC-1 mRNA Expression in A2780/CP70 Human Ovarian Cancer Cells. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4;273(36):23419–25.

Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 2000;20(2A):645–52.

Li X, Haluska P, Hsiang Y, Bharti A, Kufe D, Rubin E. Identification of Topoisomerase I Mutations Affecting Both DNA Cleavage and Interaction with Camptothecina. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;803(1):111–27.

Liedert B, Pluim D, Schellens J, Thomale J. Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei. *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar 29;34(6):e47–e47.

Lin X, Trang J, Okuda T, Howell SB. DNA Polymerase ζ Accounts for the Reduced Cytotoxicity and Enhanced Mutagenicity of Cisplatin in Human Colon Carcinoma Cells That Have Lost DNA Mismatch Repair. *Clin Cancer Res.* 2006 Jan 15;12(2):563–8.

- Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014 Sep 3;5.
- Lindahl T, Demple B, Robins P. Suicide inactivation of the *E. coli* O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *EMBO J*. 1982;1(11):1359–63.
- Lister A, Nedjadi T, Kitteringham N, Campbell F, Costello E, Lloyd B, et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol Cancer*. 2011;10(1):37.
- Liu L, Desai S, Li T, Mao Y, Sun M, Sim S. Mechanism of Action of Camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;922(1):1–10.
- Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 Activation by Cellular Stress. *Neoplasia*. 2000 May 9;2(3):208–25.
- Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275–92.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012 Jan 19;481(7381):287–94.
- Lord RVN, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 Expression Correlates with Prolonged Survival after Cisplatin plus Gemcitabine Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul 1;8(7):2286–91.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug 6;114(2):97–109.
- Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol*. 2013 May;31(3):290–7.
- Madhusudan S, Hickson ID. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends Mol Med*. 2005 Aug 2;11(11):503–11.
- Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA Methylation Biomarkers of Cancer Drug Response. *Am J Pharmacogenomics*. 2005;5(4):223–32.
- Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1291–5.
- McFaline-Figueroa JL, Braun CJ, Stanciu M, Nagel ZD, Mazzucato P, Sangaraju D, et al. Minor Changes in Expression of the Mismatch Repair Protein MSH2 Exert a Major Impact on Glioblastoma Response to Temozolomide. *Cancer Res*. 2015 Aug 1;75(15):3127–38.
- McNabb DS, Reed R, Marciniak RA. Dual Luciferase Assay System for Rapid Assessment of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2005 Sep 2;4(9):1539–49.

Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EGE. Relationship of Cellular Glutathione to the Cytotoxicity and Resistance of Seven Platinum Compounds. *Cancer Res.* 1992 Dec 15;52(24):6885–9.

Menck CFM, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol.* 2014 Mar 20;37:220–33.

Merikallio H, Pääkkö P, Kinnula VL, Harju T, Soini Y. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) and DJ1 are prognostic factors in lung cancer. *Hum Pathol.* 2012 Apr;43(4):577–84.

Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg P V, Lenz HJ, Hayashi K, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1998 Jan 1;16(1):309–16.

Meyers M, Wagner MW, Hwang H-S, Kinsella TJ, Boothman DA. Role of the hMLH1 DNA Mismatch Repair Protein in Fluoropyrimidine-mediated Cell Death and Cell Cycle Responses. *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5193–201.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. *J Clin Oncol.* 2000 Jan 1;18(1):158.

Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, et al. A Somatic Mutation of the KEAP1 Gene in Malignant Melanoma Is Involved in Aberrant NRF2 Activation and an Increase in Intrinsic Drug Resistance. *J Invest Dermatol.* 2014 Feb;134(2):553–6.

Moraes MCS, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JAP, et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett.* 2012 Jan 1;314(1):108–18.

Mulcahy RT, Bailey H, Gipp J. Up-regulation of γ -glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;34(1):67–71.

Nagasawa DT, Chow F, Yew A, Kim W, Cremer N, Yang I. Temozolomide and Other Potential Agents for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Neurosurg Clin N Am.* 2012 Apr;23(2):307–22.

Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev.* 1997 Aug 25;23(1):35–61.

Noonan EM, Shah D, Yaffe MB, Lauffenburger DA, Samson LD. O(6)-Methylguanine DNA lesions induce an intra-S-phase arrest from which cells exit into apoptosis governed by

early and late multi-pathway signaling network activation. *Integr Biol (Camb)*. 2012 Oct;4(10):1237–55.

O'Dwyer PJ, Hamilton TC, LaCreta FP, Gallo JM, Kilpatrick D, Halbherr T, et al. Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 1996 Jan;14(1):249–56.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, et al. DNA Repair by ERCC1 in Non–Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):983–91.

Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One*. 2011 Jan;6(9):e24665.

Olive PL, Banáth JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2009;76B(2):79–90.

Omuro A, LM D. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA*. 2013 Nov 6;310(17):1842–50.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. 2003;10(4):431–42.

Oren M, Rotter V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb 1;2(2).

Ortega A, Ferrer P, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Pellicer JA, et al. Down-regulation of Glutathione and Bcl-2 Synthesis in Mouse B16 Melanoma Cells Avoids Their Survival during Interaction with the Vascular Endothelium. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):39591–9.

Osawa T, Davies D, Hartley JA. Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells. *Cell Death Dis*. 2011 Aug 4;2:e187.

Paik J, Duncan T, Lindahl T, Sedgwick B. Sensitization of Human Carcinoma Cells to Alkylating Agents by Small Interfering RNA Suppression of 3-Alkyladenine-DNA Glycosylase. *Cancer Res*. 2005 Nov 15;65(22):10472–7.

Pan H, Wang H, Zhu L, Mao L, Qiao L, Su X. The Role of Nrf2 in Migration and Invasion of Human Glioma Cell U251. *World Neurosurg*. 2013 Sep;80(3–4):363–70.

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *Int J Oncol*. 2006 Jan;28(1):119–25.

Parker RJ, Eastman A, Bostick-Bruton F, Reed E. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J Clin Invest*. 1991 Mar;87(3):772–7.

- Patel JK, Didolkar MS, Pickren JW, Moore RH. Metastatic pattern of malignant melanoma: A study of 216 autopsy cases. *Am J Surg*. 1978 Jun;135(6):807–10.
- Patel PM, Suci S, Mortier L, Kruit WH, Robert C, Schadendorf D, et al. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: Final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur J Cancer*. 2011 Jul;47(10):1476–83.
- Pegg AE. Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res Mutat Res*. 2000 Apr;462(2–3):83–100.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, et al. Association between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems. *Cancer Res*. 1996 Feb 1;56(3):556–62.
- Perlis C, Herlyn M. Recent Advances in Melanoma Biology. *Oncologist*. 2004 Apr 1;9(2):182–7.
- Peterson CL, Côté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 2004 Mar 15;18(6):602–16.
- Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of Drug Resistance in Human Tumor Xenografts by 2'-Deoxy-5-azacytidine-induced Demethylation of the hMLH1 Gene Promoter. *Cancer Res*. 2000 Nov 1;60(21):6039–44.
- Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, et al. Phase I Study Of The Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor, AG014699, In Combination With Temozolomide in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 1;14(23):7917–23.
- Pontén J, Macintyre E. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968 Sep 1;74(4):465–86.
- Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*. 2010;56(2):167–79.
- Prakash A, Doublié S, Wallace SS. The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases: Substrates, Structures, and Search for Damage. *Science PWDBT-P in MB and T*, editor. *Mech DNA Repair*. 2012;110:71–91.
- Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: Specificity of Structure and Function. *Annu Rev Biochem*. 2005 Jun 1;74(1):317–53.
- Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, et al. Phase II Trial of Temozolomide Plus O6-Benzylguanine in Adults With Recurrent, Temozolomide-Resistant Malignant Glioma. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1262–7.
- Quirbt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M, Care the members of the MDSG of CCOP in E-B. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol*. 2007 Feb;14(1):27–33.

- Rajeswaran A, Trojan A, Burnand B, Giannelli M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: A systematic review of randomi. *Lung Cancer*. 2008 Jan;59(1):1–11.
- Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene–DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis*. 2003 Mar 1;24(3):461–7.
- Ratnam K, Low JA. Current Development of Clinical Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Oncology. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1383–8.
- Raza A, Galili N, Smith S, Godwin J, Lancet J, Melchert M, et al. Phase 1 multicenter dose-escalation study of ezatiostat hydrochloride (TLK199 tablets), a novel glutathione analog prodrug, in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2009 Apr 27;113(26):6533–40.
- Raza A, Galili N, Smith SE, Godwin J, Boccia R V, Myint H, et al. A phase 2 randomized multicenter study of 2 extended dosing schedules of oral ezatiostat in low to intermediate-1 risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2012;118(8):2138–47.
- Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U, et al. Correlation of p53 Mutations with Resistance to Platinum-based Chemotherapy and Shortened Survival in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 Oct 1;7(10):2984–97.
- Rocha C, Lerner L, Okamoto O, Marchetto M, Menck C. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res Mutat Res*. 2013 Jan;752(1):25–35.
- Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*. 2007 Jan 11;26(2):186–97.
- Rouse J, Jackson SP. Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage. *Science* (80-). 2002 Jul 26;297(5581):547–51.
- Rubin KM. Management of Primary Cutaneous and Metastatic Melanoma. *Semin Oncol Nurs*. 2013 Aug;29(3):195–205.
- Rudin CM, Yang Z, Schumaker LM, VanderWeele DJ, Newkirk K, Egorin MJ, et al. Inhibition of Glutathione Synthesis Reverses Bcl-2-mediated Cisplatin Resistance. *Cancer Res*. 2003 Jan 15;63(2):312–8.
- Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*. 2008;451:1116–20.

- Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh J-K, Zhong S, et al. ASPP Proteins Specifically Stimulate the Apoptotic Function of p53. *Mol Cell*. 2001 Oct 26;8(4):781–94.
- Santos J, Meyer J, Mandavilli B, Houten B. Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. *DNA Repair Protoc*. 2006;314:183–99.
- Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, et al. Mechanisms of Chemoresistance in Malignant Glioma. *Clin cancer Res*. 2008 May 15;14(10):2900–8.
- Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maebara K, Wang H, et al. Electrophile Response Element-mediated Induction of the Cystine/Glutamate Exchange Transporter Gene Expression. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44765–71.
- Sax JK, El-Deiry WS. p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ*. 2003;10(4):413–7.
- Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Apr 23;15003.
- Schmitt CA, Rosenthal CT, Lowe SW. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med*. 2000 Sep;6(9):1029–35.
- Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 2003 Mar 15;63(1):1311–6.
- Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reiszner T, et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J*. European Molecular Biology Organization; 2009 Feb 18;28(4):383–93.
- Shervington A, Lu C. Expression of Multidrug Resistance Genes in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancer Invest*. 2008 Jan 1;26(5):535–42.
- Shim G, Manandhar S, Shin D, Kim T-H, Kwak M-K. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2009 Dec 1;47(11):1619–31.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22:7265–79.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11–30.
- Silvani A, Eoli M, Salmaggi A, Lamperti E, Maccagnano E, Broggi G, et al. Phase II Trial of Cisplatin Plus Temozolomide, in Recurrent and Progressive Malignant Glioma Patients. *J Neurooncol*. 2004;66(1-2):203–8.

Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, et al. RNAi-Mediated Silencing of Nuclear Factor Erythroid-2–Related Factor 2 Gene Expression in Non–Small Cell Lung Cancer Inhibits Tumor Growth and Increases Efficacy of Chemotherapy. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):7975–84.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010 Aug 26;29(34):4741–51.

Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci.* 1996 Dec 10;93(25):14428–33.

Solis LM, Behrens C, Dong W, Suraokar M, Ozburn NC, Moran CA, et al. Nrf2 and Keap1 Abnormalities in Non–Small Cell Lung Carcinoma and Association with Clinicopathologic Features. *Clin Cancer Res.* 2010 Jul 15;16(14):3743–53.

Soltys DT, Rocha CRR, Lerner LK, de Souza TA, Munford V, Cabral F, et al. Novel XPG (ERCC5) Mutations Affect DNA Repair and Cell Survival after Ultraviolet but not Oxidative Stress. *Hum Mutat.* 2013 Jan 1;34(3):481–9.

Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 2012 Jul 19;12(8):10.1038/nrc3278.

Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Jul;63(1):12–31.

Stewart DJ, Leavens M, Maor M, Feun L, Luna M, Bonura J, et al. Human Central Nervous System Distribution of cis-Diamminedichloroplatinum and Use as a Radiosensitizer in Malignant Brain Tumors. *Cancer Res.* 1982 Jun 1;42(6):2474–9.

Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jun;8(6):473–80.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987–96.

Stupp R, Tonn J-C, Brada M, Pentheroudakis G, Group O behalf of the EGW. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May 1;21:v190–3.

Sukumari-Ramesh S, Prasad N, Alleyne C, Vender J, Dhandapani K. Overexpression of Nrf2 attenuates Carmustine-induced cytotoxicity in U87MG human glioma cells. *BMC Cancer.* 2015;15(1):118.

Swanton C. Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and Time. *Cancer Res.* 2012 Oct 1;72(19):4875–82.

Swanton C, Nicke B, Schuett M, Eklund AC, Ng C, Li Q, et al. Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 May 26;106(21):8671–6.

Tallen U, Truss M, Kunitz F, Wellmann S, Unryn B, Sinn B, et al. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (ING1) tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Neurooncol*. 2008;86(1):23–30.

Tentori L, Dorio AS, Mazzon E, Muzi A, Sau A, Cuzzocrea S, et al. The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2014 Sep 13;47(8):1219–30.

Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369–75.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jul;8(7):579–91.

Triller N, Korošec P, Kern I, Košnik M, Debeljak A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer*. 2006 Nov;54(2):235–40.

Usanova S, Piee-Staffa A, Sied U, Thomale J, Schneider A, Kaina B, et al. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer*. 2010;9(1):248.

Van de Vaart PJ, Belderbos J, de Jong D, Sneeuw KC, Majoor D, Bartelink H, et al. DNA-adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receiving daily cisplatin and radiotherapy. *Int J cancer*. 2000 Mar 20;89(2):160–6.

Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. Efficient Translesion Replication Past Oxaliplatin and Cisplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase η . *Biochemistry*. 2000 Mar 30;39(16):4575–80.

Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo J V, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012 Nov;12(11):767–75.

Vousden KH. p53: Death Star. *Cell*. 2000 Nov 22;103(5):691–4.

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr;4(4):307–20.

Wang H, Cai S, Ernstberger A, Bailey BJ, Wang MZ, Cai W, et al. Temozolomide-Mediated DNA Methylation in Human Myeloid Precursor Cells: Differential Involvement of Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways. *Clin Cancer Res*. 2013 May 15;19(10):2699–709.

- Wang R, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008a Aug 15;373(1):151–4.
- Wang X-J, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*. 2008b Jun 15;29(6):1235–43.
- Wang Y, Teicher BA, Shea TC, Holden SA, Rosbe KW, Al-Achi A, et al. Cross-Resistance and Glutathione-S-transferase- π Levels among Four Human Melanoma Cell Lines Selected for Alkylating Agent Resistance. *Cancer Res*. 1989 Nov 15;49(22):6185–92.
- Wang Y, Zhao R, Goldman ID. Decreased expression of the reduced folate carrier and folypolyglutamate synthetase is the basis for acquired resistance to the pemetrexed antifolate (LY231514) in an L1210 murine leukemia cell line. *Biochem Pharmacol*. 2003 Apr 1;65(7):1163–70.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927 Mar 7;8(6):519–30.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
- Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res*. Springer-Verlag; 1998;292(3):435–45.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010 Jan;6(1):39–51.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):492–507.
- Westermarck B, Pontén J, Hugosson R. Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A Pathol*. 1973 Dec 1;81A(6):791–805.
- Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Perneczky A, Kaina B. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *Int J Cancer*. 2008;122(6):1391–9.
- Wilson III DM, Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res Repair*. 2001 May 10;485(4):283–307.
- Wolbers JG. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer*. 2014 Jan 20;33(1):8–15.
- Wrighton KH. DNA repair: Time to switch. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jun;10(6):371.

Wynne P, Newton C, Ledermann JA, Olaitan A, Mould TA, Hartley JA. Enhanced repair of DNA interstrand crosslinking in ovarian cancer cells from patients following treatment with platinum-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007 Sep 11;97(7):927–33.

Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. ATR Kinase Activation Mediated by MutS α and MutL α in Response to Cytotoxic O6-Methylguanine Adducts. *Mol Cell*. 2006 May 19;22(4):501–10.

Youn C-K, Kim M-H, Cho H-J, Kim H-B, Chang I-Y, Chung M-H, et al. Oncogenic H-Ras Up-Regulates Expression of ERCC1 to Protect Cells from Platinum-Based Anticancer Agents. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4849–57.

Yu S, Khor TO, Cheung K-L, Li W, Wu T-Y, Huang Y, et al. Nrf2 Expression Is Regulated by Epigenetic Mechanisms in Prostate Cancer of TRAMP Mice. *PLoS One*. 2010 Jan 5;5(1):e8579.

Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J Investig Surg*. 2012 Mar 22;25(2):67–77.

Zaman GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 Aug 15;92(17):7690–4.

Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ. p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 May 26;95(11):6163–8.

Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Sep;23(7):722–8.

Zhang W, Wang Z, Shu F, Jin Y, Liu H, Wang Q, et al. Activation of AMP-activated Protein Kinase by Temozolomide Contributes to Apoptosis in Glioblastoma Cells via p53 Activation and mTORC1 Inhibition. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40461–71.

Zhou W, Yang Y, Xia J, Wang H, Salama ME, Xiong W, et al. NEK2 Induces Drug Resistance Mainly through Activation of Efflux Drug Pumps and Is Associated with Poor Prognosis in Myeloma and Other Cancers. *Cancer Cell*. 2013a Jan 14;23(1):48–62.

Zhou Y, Wang H, Zhu L, Cong Z, Li N, Ji X, et al. Knockdown of Nrf2 enhances autophagy induced by temozolomide in U251 human glioma cell line. *Oncol Rep*. 2013b;29:394–400.

Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jan 15;73(2):298–307.

Zustovich F, Lombardi G, Della Puppa A, Rotilio A, Scienza R, Pastorelli D. A phase II study of cisplatin and temozolomide in heavily pre-treated patients with temozolomide-refractory high-grade malignant glioma. *Anticancer Res*. 2009 Oct;29(10):4275–9.

APÊNDICE

SÚMULA CURRICULAR

ARTIGOS PUBLICADOS

PEDROSO JL, **ROCHA CRR**, MACEDO-SOUZA LI, MARQUES VMW, BARSOTTINI OGP, OLIVEIRA ASD, MENCK CFM, KOK F, Mutation in pnkp presenting initially as axonal charcot-marie-tooth disease. *Neurology Genetics*, v.1, e30, 2015.

MELO US, MACEDO-SOUZA LI, FIGUEIREDO T, MUOTRI AR, GLEESON JG, COUX G, ARMAS P, CALCATERRA NB, KITAJIMA JP, AMORIM S, OLÁVIO TR, GRIESI-OLIVEIRA K, COATTI GC, **ROCHA CRR**, MARTINS-PINHEIRO M, MENCK CF, ZAKI MS, KOK F, ZATZ M, SANTOS S. Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome. *Human Molecular Genetics*, Sep 18. pii: ddv388. [Epub ahead of print], 2015.

ROCHA, CRR; GARCIA, CCM; VIEIRA, DB; QUINET, A; DE ANDRADE-LIMA, LC; MUNFORD, V; BELIZÁRIO, JE; MENCK, CFM. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death & Disease*, v. 5, p. e1505, 2014.

QUINET, A; VESSONI, ALEXANDRE T; **ROCHA, CRR**; BIARD, DENIS; SARASIN, ALAIN; MENCK, CFM; STARY, ANNE. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair*, v. 14, p. 27-38-38, 2014.

MORELI, JB; SANTOS, JH; **ROCHA, CRR**; DAMASCENO, DC; MORCELI, G; RUDGE, MV; BEVILACQUA, E; CALDERON, IMP. DNA Damage and Its Cellular Response in Mother and Fetus Exposed to Hyperglycemic Environment. *BIOMED RES INT*, v. 2014, p. 1-9, 2014.

ROCHA, CRR; LERNER, LK; OKAMOTO OK; MARCHETTO, MC; MENCK, CFM. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, v. 752, p. 25-35, 2013.

BERRA, MC; DE OLIVEIRA, CS; GARCIA, CCM; **ROCHA, CRR**; LERNER, LK; ANDRADE-LIMA, LC; BAPTISTA, MS; MENCK, CFM. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 61, p. 343-356, 2013.

SOLTYS, DT; **ROCHA, CRR**; LERNER, LK; DE SOUZA, TA; MUNFORD, V; CABRAL, F; NARDO, T; STEFANINI, M; SARASIN, A; CABRAL-NETO, JB; MENCK,

CFM. Novel *XPG* (*ERCC5*) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Human Mutation*, v. 34, p. 481-489, 2012.

GOMES, SZ; LORENZON, AR; VIEIRA, JS; **ROCHA, CRR**; BANDEIRA, C; HOSHIDA, MS; LPES, LR; BEVILACQUA, E. Expression of NADPH Oxidase by Trophoblast Cells: Potential Implications for the Post-Implanting Mouse Embryo. *Biology of Reproduction*, v. 86, p. 1167-1172, 2011.

PRÊMIOS

2014

- Destaque em Publicação Científica, Departamento de Microbiologia-USP.
- Bolsa de Mobilidade Internacional, Banco Santander.

2013

- Melhor Pôster no 5th Meeting on Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, .
- Mutagenesis Award - NIH at 11th ICEM, National Institute of Health.
- Melhor Revisão, Departamento de Microbiologia ICB-USP.

2012

- Prêmio Pós-Graduação - Melhor apresentação oral na área de mutagênese, Sociedade Brasileira de Genética.
- Prêmio melhor Painele - Categoria Pós-graduação - Doutorado, da XII Reunião Científica do Departamento de Microbiologia, Departamento de Microbiologia -Instituto de Ciências Biomédicas-USP.