

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

Juliana Ferreira de Sousa

**Estudo funcional de genes de reparo de DNA superexpressos em
glioblastoma multiforme**

**Araraquara, SP
2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

Juliana Ferreira de Sousa

**Estudo funcional de genes de reparo de DNA superexpressos em
glioblastoma multiforme**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biologia Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valeria Valente

**Araraquara, SP
2014**

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Sousa, Juliana Ferreira de
S725e Estudo funcional de genes de reparo de DNA superexpressos em glioblastoma multiforme / Juliana Ferreira de Sousa. – Araraquara, 2014.
59 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração Biologia Celular.

Orientador: Valéria Valente.

1. Glioma. 2. Astrocitoma. 3. GBM. 4. Reparo de DNA. Valente, Valéria, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

**À minha mãe, que é e sempre foi peça fundamental em tudo que
faço. A ela devo tudo que sou.**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Gliomas.....	11
1.2 Tratamento	13
1.3 Vias de reparo de DNA.....	13
1.3.1 Reparo por excisão de bases.....	15
1.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos	18
1.3.3 Reparo do pareamento errôneo	18
1.3.4 Recombinação Homóloga e junção não-homóloga de extremidades.....	18
1.7 Genes de reparo de DNA em estudo.....	22
1.7.1 APEX1	22
1.7.2 BRCA2	22
1.7.3 BRIP1	23
1.7.4 EXO1.....	24
1.7.5 NEIL3.....	24
1.7.6 RAD54L	25
1.7.7 XRCC2	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Amostras de tecido normal e tumoral	28
3.2 Avaliação do nível de expressão dos genes	28

3.3	Análise estatística e relação dos perfis de expressão com dados clínicos	29
3.4	Ensaio funcional de silenciamento.....	30
3.4.1	Cultivo celular e transfecção	30
3.4.2	Análise de eficiência do silenciamento	31
3.5	Análise de ciclo celular pela avaliação do conteúdo de DNA.....	31
3.6	Avaliação de apoptose e morte celular	31
4	RESULTADOS	33
4.1	Avaliação dos níveis de expressão dos genes de reparo selecionados em astrocitomas	33
4.2	Avaliação dos níveis de expressão dos genes de reparo selecionados em linhagens celulares de GBM	38
4.3	Distribuição das células HDPC, T98G e U138MG no ciclo celular após o silenciamento de EXO1 ou NEIL3	40
4.4	Avaliação da viabilidade das células HDPC, T98G e U138MG após silenciamento de EXO1 ou NEIL3	41
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Os tumores cerebrais primários mais comuns são denominados gliomas. Eles são definidos patologicamente pela presença de características histológicas e imuno-histoquímicas que evidenciam diferenciação glial. De acordo com a suposta linhagem de origem, eles são classificados como astrocitomas, oligodendrogliomas ou ependimomas. Dentre eles, os astrocitomas são os mais comuns e agressivos. O tratamento atualmente utilizado inclui remoção cirúrgica seguida de quimioterapia com temozolamida (TMZ) e radioterapia, porém sua eficácia é muito baixa devido à alta resistência das células tumorais. Buscando encontrar genes associados com a elevada resistência dos astrocitomas, realizamos um estudo anterior de expressão gênica diferencial utilizando uma coleção de genes de reparo de DNA. Nesta análise foram identificados sete genes significativamente superexpressos em glioblastoma multiforme (GBM), o tipo mais agressivo de astrocitoma. Estes genes são: APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2. Através de RT-PCR quantitativo, avaliamos os níveis de expressão destes genes em um painel expandido de 54 casos clínicos de astrocitomas de diferentes graus de malignidade e em 5 linhagens celulares de GBM. Todos os genes analisados mostraram-se mais expressos nos astrocitomas, com exceção de RAD54L em amostras de astrocitoma de grau II. Além disso, a superexpressão dos 7 genes avaliada isoladamente não exerce influência direta na sobrevida dos pacientes. Evidenciou-se ainda a superexpressão mais acentuada de EXO1 e NEIL3, que foram selecionados para realização de ensaios funcionais de silenciamento, e avaliação do ciclo celular e taxas de apoptose/morte efetiva das células. Estes ensaios foram realizados com as linhagens celulares T98G e U138MG, que apresentaram maiores níveis de expressão destes genes. Nos ensaios funcionais, observamos que o silenciamento de EXO1 ou NEIL3 não provoca alterações nas taxas de apoptose e morte celular e não altera a distribuição das células no ciclo. O silenciamento desses dois genes não sensibiliza as células T98G e U138MG à radiação ionizante.

ABSTRACT

Gliomas are the most common type of primary brain cancers. They are pathologically defined by the presence of histological and immunohistochemical characteristics that evidence glial differentiation. According to the hypothetical cell of origin they are classified in: astrocytomas, oligodendrogliomas and ependimomas. Among them, astrocytomas are the more common and aggressive type. The treatment currently used for GBM includes surgical resection of tumor followed by chemotherapy with temozolamide (TMZ) and radiotherapy, but this protocol is still insufficient due to the high resistance of cancer cells. Searching for repair genes associated with the high resistance of astrocytomas, we developed a previous study of differential gene expression using a collection of DNA repair genes. In this analysis, we identified seven genes significantly overexpressed in glioblastoma multiforme (GBM), namely: APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L and XRCC2. Using quantitative RT-PCR, we evaluated the expression of these genes in an expanded panel of samples with 54 clinical cases of different grade astrocytomas and five GBM cell lines. All genes showed expression significantly higher in astrocytomas, except RAD54L in grade II astrocytomas. Moreover, the overexpression of this 7 genes evaluated individually doesn't exert direct influence upon patient's survival rate. Remarkably, EXO1 and NEIL3 showed the higher fold changes and were chosen for functional silencing assays. This experiments were performed with T98G and U138MG cell lines that showed the higher expression levels among the GBM cell lines analyzed. In the functional assays, we observed that the silencing of EXO1 or NEIL3 doesn't induce changes in the apoptosis and cell death rates and doesn't change the distribution of cells in cycle. Beyond this, the silencing of this two genes doesn't sensitizes cells to ionizing radiation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - absorbância

AP - apurínico/apirimidínico

APEX1 - AP exonuclease 1

ASTII - astrocitoma de grau II

ASTIII - astrocitoma de grau III

BER - base excision repair

BRCA2 - Breast Cancer 2

BRIP1 - BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSB - Double Strand Break

EDTA - ethylene diamine tetracetic acid

EXO1 - Exonuclease 1

GBM - glioblastoma multiforme

HJURP - Holliday Junction Recognizing Protein

HR - Homologus Recombination

MMR - Mismatch Repair

NEIL3 - Nei Endonuclease VIII-like

NER - Nucleotide Excision Repair

NHEJ - Non-Homologus End Joining

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR - Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real

RAD54L - RAD54-like *S. cerevisiae*

RNA - ácido ribonucleico

SB - substância branca não-tumoral

SFB - Soro Fetal Bovino

siRNA - small interfering RNA

SNP - single nucleotide polymorphism

UV - radiação ultravioleta

XRCC2 - X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografias representativas (40x) de ASTII, ASTIII e GBM - página 12

Figura 2. Tipos de danos ao DNA e mecanismos de reparo - página 14

Figura 3. Ação da MGMT e outros mecanismos de reparo que atuam nos danos causados pelo agente alquilante TMZ em células de glioma - página 16

Figura 4. Sucessão de eventos da via de BER - página 17

Figura 5. Modelo para os mecanismos de “Global Genome NER” (GG-NER) e “Transcription-Coupled Repair” (TCR) - página 19

Figura 6. Modelo do mecanismo de reparo de pareamento errôneo (MMR) - página 20

Figura 7. Representação esquemática dos mecanismos de reparo através de recombinação homóloga (HR) e de junção não-homóloga (NHEJ) - página 21

Figura 8. Expressão relativa de mRNA dos 7 genes em estudo - página 36

Figura 9. Curvas de sobrevida de pacientes com glioma com base na expressão dos genes em estudo - página 37

Figura 10. Expressão relativa dos genes em estudos em linhagens celulares - página 39

Figura 11. Avaliação da distribuição de células silenciadas ou não no ciclo celular - página 40

Figura 12. Avaliação do efeito do silenciamento de EXO1 e NEIL3 - página 42

Figura 13. Avaliação do efeito da radiação ionizante em células silenciadas - página 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR - página 29

Tabela 2. Sequências de siRNAs desenhadas para cada gene em estudo - página 30

Tabela 3. Dados de expressão relativa de mRNA observados para cada paciente e cada gene avaliado. São apresentadas as médias e medianas para cada gene de acordo com o grupo tumoral - páginas 34 e 35

Tabela 4. Número de amostras de astrocitoma com expressão significativamente alterada em cada intervalo de expressão, quando comparadas com substância branca não-tumoral (SB) - página 35

Tabela 5. Expressão relativa (fold change) média dos genes em estudo nas linhagens celulares, quando compara-das com a linhagem não tumoral (HDPC) - página 38

Tabela 6. Porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular 2, 3 ou 5 dias após a trans-fecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3 - página 41

Tabela 7. Porcentagem média de células viáveis, apoptóticas e mortas 4 ou 7 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3 e 4 dias após a transfecção sob efeito de radiação ionizante - página 41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

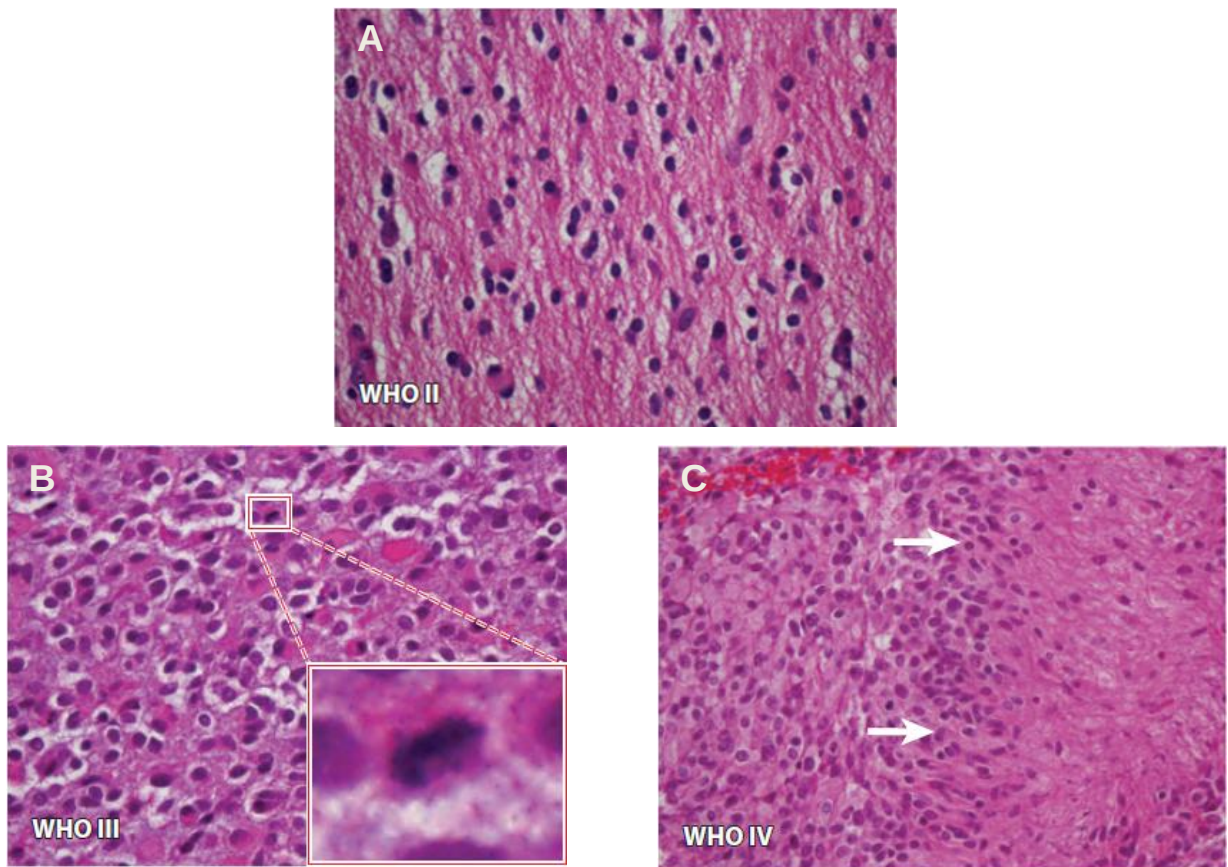
Os gliomas são tumores cerebrais definidos patologicamente pela presença de células com características histológicas e imuno-histoquímicas que evidenciam diferenciação glial (Vescovi et al., 2006). Estes são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central em adultos (Farias-Eisner et al., 2012), altamente heterogêneos e de etiologia desconhecida na maioria dos casos (Wiencke et al., 2005). De acordo com os tipos celulares que predominam na massa tumoral eles são classificados como astrocitomas, oligodendrogliomas ou tumores mistos, os oligoastrocitomas. Dentre eles, os astrocitomas são os mais frequentes em adultos. Estes tumores normalmente apresentam infiltração difusa no tecido adjacente, são resistentes aos tratamentos e têm uma tendência natural para a progressão maligna (Vescovi et al., 2006). Embora molecular e clinicamente representem entidades únicas (Marko & Weil, 2013), a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os astrocitomas em quatro graus de acordo com suas características histológicas e comportamento biológico.

Os astrocitomas de grau I (AST I) ocorrem principalmente em crianças (Fang et al., 2013), são histologicamente benignos, apresentam células bem diferenciadas e com baixas taxas de proliferação, sendo curáveis quando a remoção cirúrgica é possível (Denysenko et al., 2010). São eles: astrocitoma subependimal de células gigantes e astrocitoma pilocítico (Louis, 2007). Os astrocitomas que ocorrem em adultos tem a capacidade de infiltrar o tecido não-tumoral adjacente, tem tendência natural a progressão maligna e são geralmente classificados como astrocitomas de grau II a IV (Fang et al., 2013). Desse modo, os ASTI não considerados como um estágio de progressão dos astrocitomas e não são abordados neste estudo.

Os astrocitomas de grau II (AST II) apresentam células diferenciadas e com proliferação moderada (Figura 1A), mas devido à infiltração difusa no tecido adjacente não são curáveis através de ressecção cirúrgica e, em aproximadamente 70% dos casos, evoluem para grau III e IV dentro de 5 a 10 anos (Denysenko et al., 2010). São eles: astrocitoma pilomixóide, astrocitoma difuso e xantoastrocitoma pleomórfico.

Os astrocitomas de grau III (AST III) são hipercelulares, apresentam grande anaplasia e taxas de proliferação mais elevadas do que os ASTII (Figura 1B), sendo portanto considerados malignos. Estes tumores apresentam evolução mais rápida e, normalmente, levam os pacientes a óbito dentro de 2 a 5 anos (Denysenko et al., 2010; Fang et al., 2013).

Figura 1. Micrografias representativas (40x) de ASTII, ASTIII e GBM.



(A) AST II representa o início da progressão tumoral e mostra anaplasia, (B) ASTIII exibe atividade mitótica aumentada (ver figura metafásica no detalhe ampliado) e (C) GBM apresenta regiões de necrose com pseudopalisada (setas). Adaptado de Huse et al., 2012.

Os astrocitomas de grau IV são comumente denominados glioblastomas ou gliosarcomas devido a extensa aparência de desdiferenciação das células que o compõem. Estes tumores exibem as características de malignidade mais agressivas, de 3 a 5 vezes maiores do que ASTIII, como: anaplasia e proliferação celular muito elevadas, extensa infiltração difusa, pronunciada angiogênese (proliferação microvascular), necrose e invasividade (Figura 1C) (Denysenko et al., 2010; Fang et al., 2013). São eles: glioblastoma multiforme (GBM), glioblastoma de células gigantes e gliosarcoma (Louis, 2007). Estes tumores afetam indivíduos de qualquer idade, sendo que o pico de incidência ocorre em pessoas com idade entre 45-70 anos. Os GBMs, além de mais agressivos, são o tipo mais frequente de astrocitoma, eles totalizam 12-15% das neoplasias intracranianas e 50-60% dos astrocitomas (Ohgaki, 2005). Devido a alta agressividade e elevada resistência dos GBMs a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, os pacientes acometidos apresentam sobrevida média de apenas 6 a 12 meses após o diagnóstico ou 12 a 15 meses quando sob tratamento agressivo (Skalli, 2013). Menos de 5% dos pacientes sobrevivem mais que 5 anos (Fang et al., 2013).

Portanto, mesmo sendo tumores de baixa incidência eles representam um grave problema de saúde pública, pois estão associados com taxas de morbidade extremamente elevadas e sobrevida muito curta.

1.2 Tratamento

O tratamento padrão atual consiste na realização de ressecção cirúrgica do tecido tumoral seguida de radio e quimioterapia, cujo esquema terapêutico é montado de acordo com cada caso. Porém, mesmo sob esse tratamento agressivo o prognóstico permanece muito pobre. Isto se deve a alta invasividade e a resistência elevada das células de GBM, que promovem a recidiva rápida em praticamente todos os casos (Sze, 2013; Agnihotori, 2013).

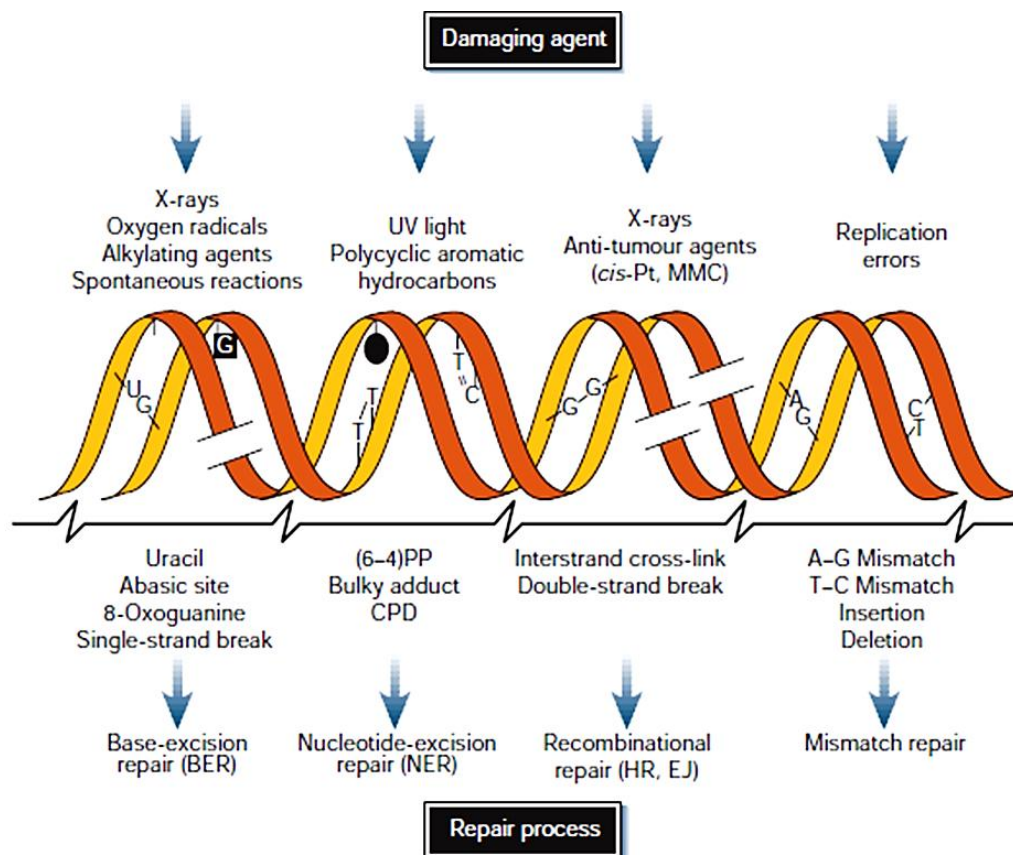
Na quimioterapia podem ser usados fármacos intercalantes ou alquilantes de DNA e inibidores de topoisomerasas 1 e 2 (Bai et al., 2011). O quimioterápico padrão-ouro no tratamento de GBM é o agente alquilante de DNA temozolamida (TMZ) (Sze, 2013), que adiciona grupamentos metil nas bases nitrogenadas do DNA, promovendo a morte das células quando as lesões não são reparadas. A nível molecular a radioterapia e as quimioterapias, atualmente disponíveis para tumores cerebrais, são baseadas na indução de lesões no DNA das células tumorais, o que promoveria a morte destas células (Santivasi & Xia, 2013).

1.3 Vias de reparo de DNA

Muitas vezes os danos induzidos pela radio e quimioterapia podem ser revertidos pela ação da maquinaria de reparo de DNA, o que impede a morte celular caso o reparo ocorra de forma rápida e eficiente. Um exemplo disso é a associação entre os níveis de expressão proteína O6-metilguanina metiltransferase (MGMT), responsável pela desmetilação do DNA, e o prognóstico de sobrevida dos pacientes. O estado de metilação do promotor do gene MGMT está associado com a melhor resposta dos pacientes com GBM ao tratamento com TMZ (Hegi et al., 2005; Qiu, 2013), pois a metilação do promotor provoca seu silenciamento. Desse modo, os pacientes que tem baixos níveis de expressão da enzima MGMT estão mais suscetíveis a ação da droga TMZ e respondem melhor ao tratamento. Mais recentemente, foi observada uma forte evidência de que a superexpressão do gene HJURP, envolvido no mecanismo de reparo através de recombinação homóloga, está correlacionada com a sobrevida dos pacientes e pode ser usada como um fator independente de predição de prognóstico (Valente et al., 2013). Estes dados sugerem que outros genes de reparo de DNA também podem estar associados com a resistência do GBM à radio e à quimioterapia.

Mais de 130 genes já foram identificados e classificados em 4 vias principais de reparo de DNA: excisão de bases (*BER – Base Excision Repair*), excisão de nucleotídeos (*NER – Nucleotide Excision Repair*), pareamento errôneo (*MMR – Mismatch Repair*) e reparo de quebra na dupla-fita (*DSBR – Double Strand Break Repair*) (Qian et al., 2011; Wood et al., 2001), que inclui recombinação homóloga (*HR – Homologous Recombination*) e junção não-homóloga de extremidades (*NHEJ – Non Homologous End Joining*). Alterações nessas vias tem sido associadas ao risco do câncer (Santivasi & Xia, 2013), síndromes relacionadas a câncer (Christmann et al., 2003) e maior ou menor sensibilidade a agentes quimioterápicos (Hegi et al., 2005, Bobola et al., 2012). Essas vias apresentam muitas proteínas em comum, ou seja, uma determinada proteína pode desempenhar funções em mais de uma via de reparo e os mecanismos são geralmente sobrepostos para garantir a manutenção da estabilidade do genoma (Hoeijmakers, 2001). Além disso, cada uma dessas vias é responsável pela correção de danos específicos que podem ocorrer espontaneamente ou através de indução pela ação de agentes químicos ou físicos (Hoeijmakers, 2001) (Figura 2).

Figura 2. Tipos de danos ao DNA e mecanismos de reparo.



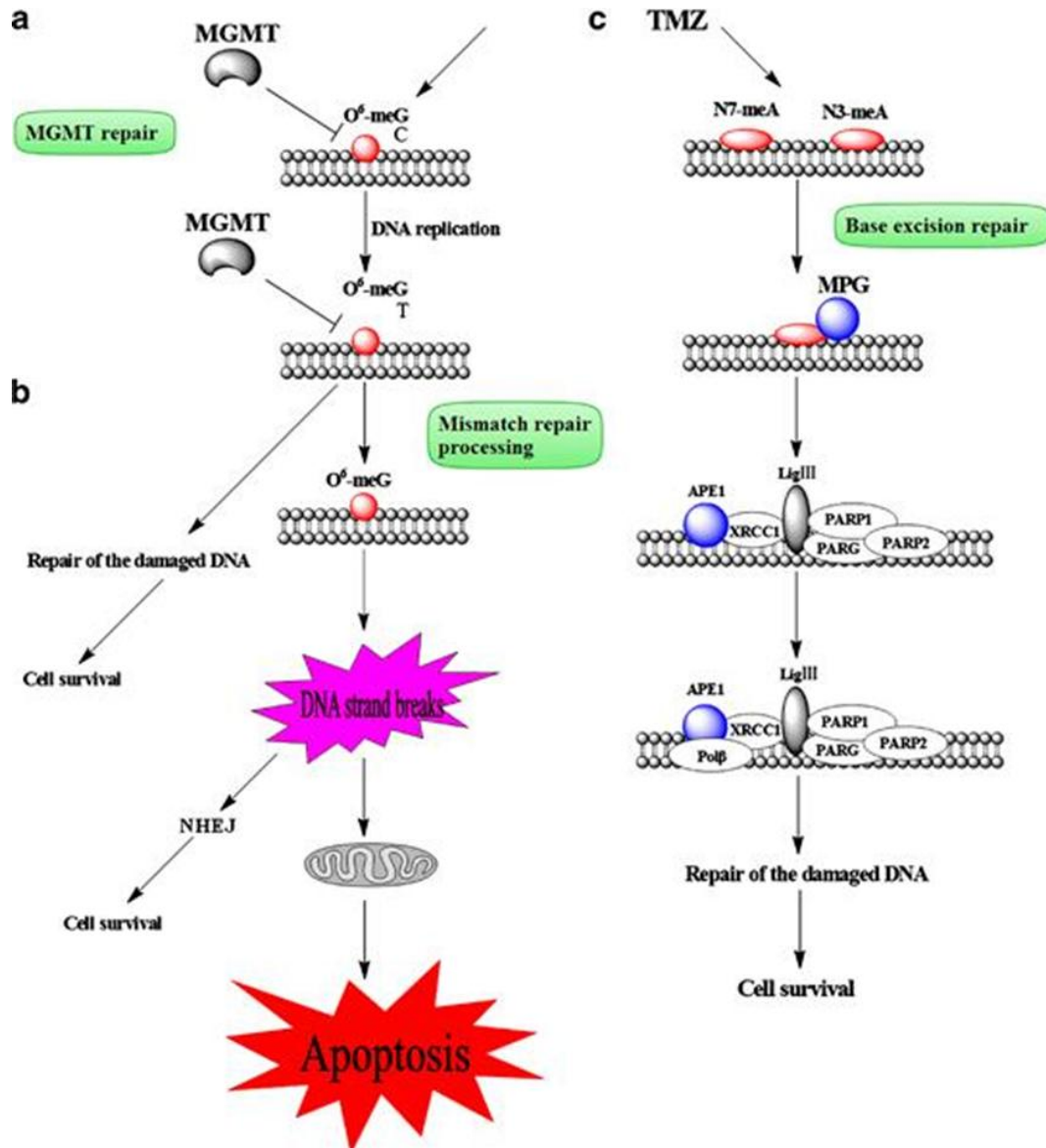
Estão representados os agentes lesivos mais comuns (topo), os danos que eles induzem no DNA (meio) e os mecanismos de reparo mais relevantes (abaixo). Esquema adaptado de Hoeijmakers et al. (2001).

A ativação de um gene de reparo de DNA depende do tipo de dano causado, seja por um agente químico ou físico. No caso da TMZ, é possível que ocorra a ativação da maioria das vias de reparo (Figura 3). A TMZ, em pH fisiológico, é convertida a 5-3-(methyltriazene-1-yl) imidazole-4-carboximide (MTIC) e então é degradada a um cátion metildiazólio que é capaz de metilar o DNA. Essas metilações ocorrem em diferentes regiões do DNA com frequências distintas: na posição N7 da guanina (60-80%), na posição N3 da adenina (10-20%) e na posição O6 da guanina (5-10%). Embora seja a menos frequente, a metilação em O6 é o dano que mais efetivamente induz efeito citotóxico e é reparado principalmente pelo gene MGMT. Durante o reparo do dano na posição O6 das guaninas pela MGMT, O6-MeG pode parear com uma citosina ou timina e então é também ativada a via MMR. Caso esta via não seja capaz de realizar o reparo, ocorre quebra na dupla fita de DNA provocando o recrutamento dos genes das vias de reparo correspondentes (HR ou NHEJ), o que pode reparar o dano ou desencadear um processo de morte celular. Quando a metilação ocorre nas posições N3 da adenina e/ou N7 da guanina os danos são reconhecidos pela via BER. Se o mecanismo de BER não for capaz de reparar estes danos, pode ocorrer quebra de fita simples de DNA e consequente ativação de genes da via de reparo correspondente ou pode ocorrer quebra de fita dupla, ativando HR ou NHEJ (Yoshimoto et al., 2012 e Fan et al., 2013).

1.3.1 Reparo por excisão de bases

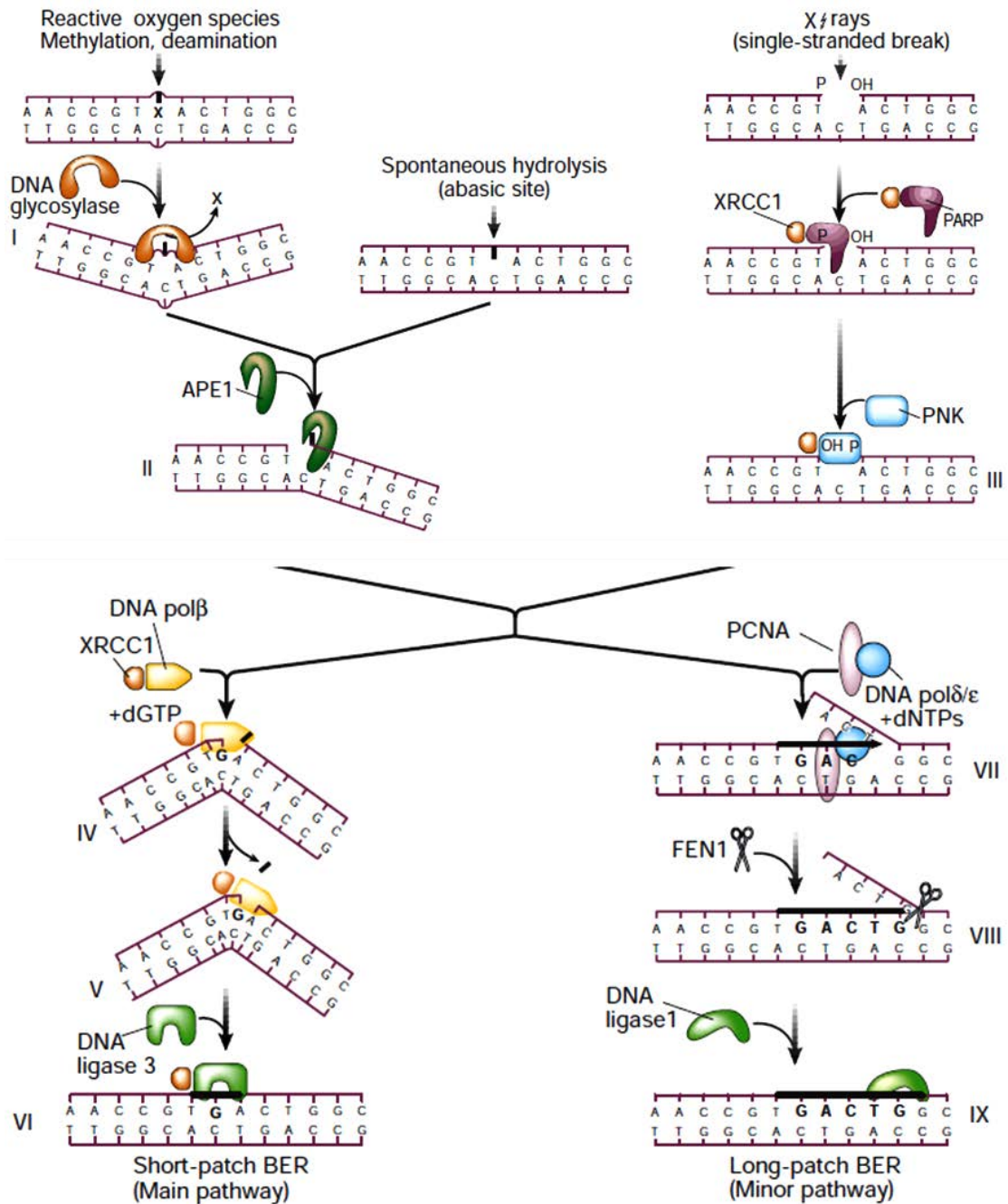
O reparo realizado por BER (Figura 4) é o principal guardião contra danos causados pelo metabolismo da própria célula, incluindo aqueles causados por espécies reativas de oxigênio, metilação, desaminação e hidroxilação. Com menor frequência, BER identifica e corrige quebras de simples-fita, como acontece na ação dos raios X. Este processamento envolve enzimas DNA-glicosilases, cada uma capaz de reconhecer um tipo de base alterada e catalisar sua remoção hidrolítica, formando um sítio AP (Hoeijmakers, 2001). Esses sítios aparecem frequentemente no DNA por hidrólise espontânea e pela ação de agentes lesivos. Sítios AP não corrigidos são pré-mutagênicos, pois podem afetar a replicação normal do DNA (Baute & Depicker, 2008).

Figura 3. Ação da MGMT e outros mecanismos de reparo que atuam nos danos causados pelo agente alquilante TMZ em células de glioma.



(a) MGMT remove grupos metil ligados na posição O6 das guaninas. (b) Se uma O6-metilguanina escapa do reparo de MGMT, formará par com uma timina na próxima replicação. A base mal pareada ativará a via de pareamento errôneo (MMR). Se o reparo através de MMR não ocorrer adequadamente, podem surgir quebras no DNA que ativariam o mecanismo de NHEJ, e se este também falhar, haveria ativação apoptose. (c) N7 e N3-metilguaninas são eficientemente reparadas pela via de excisão de bases (BER). (Fan et al., 2013).

Figura 4. Sucessão de eventos da via de BER.



O reparo pela via de BER é iniciado em uma quebra de fita-simples pela ação de uma glicosilase que é seguida pela ação da endonuclease APE1. As enzimas poli ADP-ribose polimerase (PARP) e a polinucleotídeo quina quinase (PNK) também são importantes para o reconhecimento e a correção. O reparo da lesão pode seguir dois caminhos: um mais curto e predominante (Short-patch BER) e outro mais longo (Long-patch BER). Adaptado de Hoeijmakers et al. (2001).

1.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

O reparo realizado pela via NER (Figura 5) é o mais versátil de todos no que tange o reconhecimento da lesão (Tornaletti & Hanawalt, 1999). De maneira geral, quando o sistema NER encontra uma lesão volumosa, as enzimas que o compõem promovem a clivagem da ligação fosfodiéster da fita anormal dos dois lados da lesão com alguns nucleotídeos a mais como margem de segurança. A DNA helicase remove o oligonucleotídeo fita simples lesado e a DNA polimerase preenche o espaço deixado, sendo que a DNA ligase é responsável por ligar a fita ao fragmento recém-sintetizado (Alberts *et al.*, 2010; Jagirdar *et al.*, 2013).

1.3.3 Reparo do pareamento errôneo

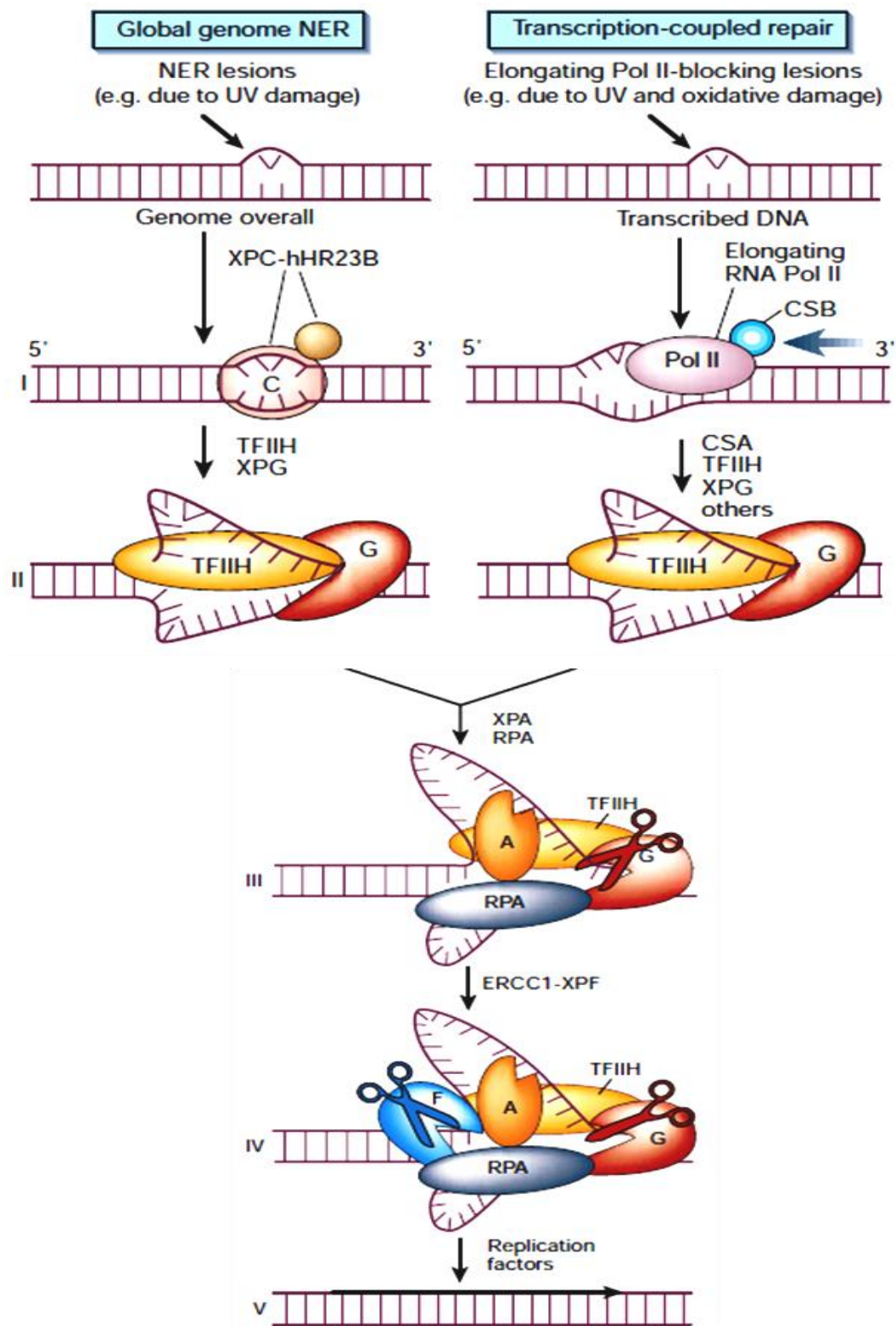
MMR (Figura 6) promove a remoção de nucleotídeos pareados de maneira errada pela DNA polimerase e bolhas na dupla-fita causadas por inserção/deleção. O processo segue quatro passos bem delineados: 1) reconhecimento do erro; 2) recrutamento de fatores de MMR; 3) rastreamento de um sinal que identifica a fita recém-sintetizada que contém o erro; e 4) nova síntese da parte excisada (Hoeijmakers, 2001).

1.3.4 Recombinação Homóloga e junção não-homóloga de extremidades

As vias de reparo HR e NHEJ (Figura 7), identificam e corrigem quebras de dupla-fita geradas durante a replicação ou por radiação UV ou raios-X, radicais livres, compostos químicos (Zhou & Paull, 2013). Após a detecção da quebra, uma complexa cascata de reações é desencadeada para parar o ciclo celular e recrutar fatores de reparo (Zhou & Elledge, 2000; Khanna & Jackson, 2001).

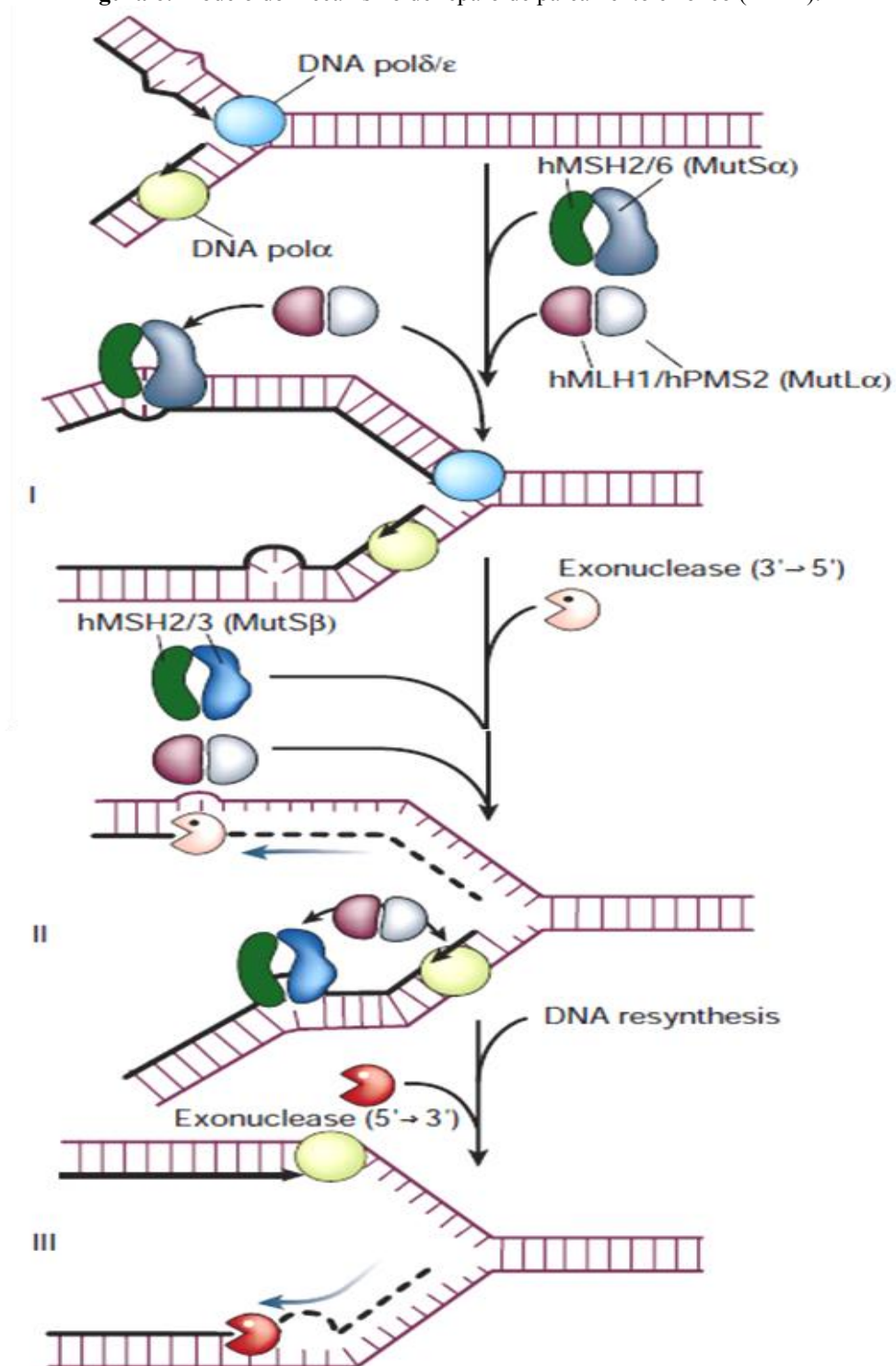
Na via HR, a quebra no DNA é regenerada utilizando a cromátide-irmã como molde no momento da replicação, ou seja, é limitada às fases S e G2 do ciclo celular (Zhou & Paull, 2013). Assim que a quebra é detectada, uma exonuclease degrada parte da extremidade 5' deixando a extremidade 3' livre. Essa extremidade livre invade a fita dupla íntegra da cromátide-irmã e uma polimerase preenche a quebra usando-a como molde (Alberts *et al.*, 2010). Caso a célula esteja em G1, existe apenas o cromossomo homólogo que é de difícil acesso no genoma, além de ser potencialmente danoso utilizá-lo como molde no reparo já que isso pode levar mutações recessivas à homozigose. Nesta situação, é ativada a via NHEJ, na qual um complexo protéico protege e aproxima as extremidades da quebra e recruta uma ligase que promove a reação de ligação (Hoeijmakers, 2001) sem a necessidade de molde porém com maior propensão a erros (Khanna & Jackson, 2001; Van Gent *et al.*, 2001).

Figura 5. Modelo para os mecanismos de “Global Genome NER” (GG-NER) e “Transcription-Coupled Repair” (TCR).



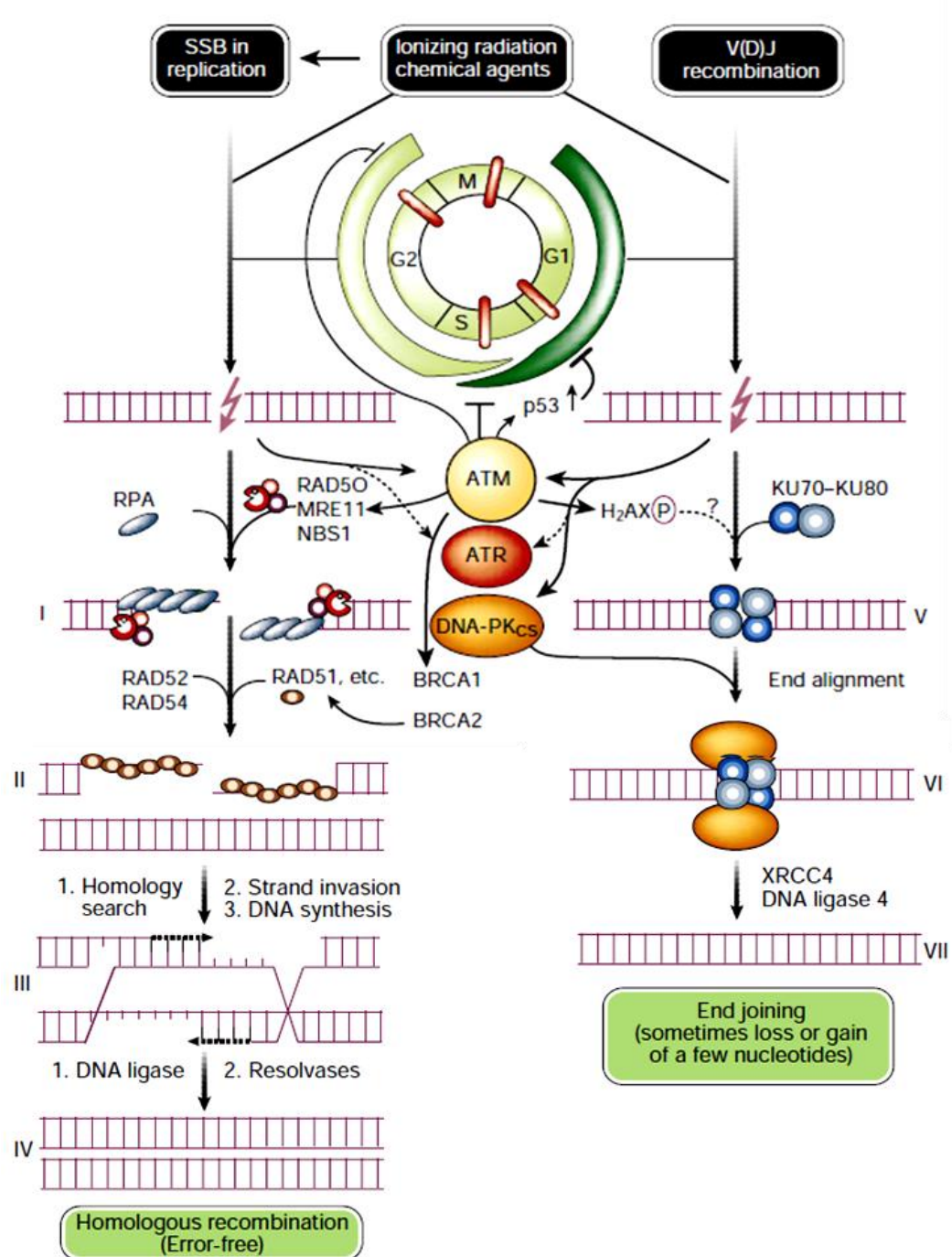
Em GG-NER, o complexo XPC-hHR23B procura e se liga a distorções na dupla-hélice. Em TCR a lesão bloqueia a passagem da polimerase o que atrai fatores de correção. Ambos os processos sinalizam o início do reparo do DNA e recrutam os demais fatores necessários para a continuidade do processo. Após a remoção da região lesionada as vias se juntam, realizando processos idênticos. Esquema adaptado de Hoeijmakers et al. (2001).

Figura 6. Modelo do mecanismo de reparo de pareamento errôneo (MMR).



Heterodímeros de hMSH2/6 reconhecem bases mal pareadas e bolhas de base única, enquanto dímeros de hMSH2/3 reconhecem bolhas provocadas por inserção/deleção. Os complexos heterodiméricos hMLH1/hPMS2 e hMLH1/hPMS1 interagem com os complexos de MSH e fatores de replicação. Uma exonuclease 3' $\rightarrow$ 5' excisa a bolha e uma polimerase realiza a nova síntese do fragmento. Adaptado de Hoeijmakers et al. (2001).

Figura 7. Representação esquemática dos mecanismos de reparo através de recombinação homóloga (HR) e de junção não-homóloga (NHEJ).



A opção por uma via ou outra é feita de acordo com a etapa do ciclo celular que a célula se encontra. Havendo o fácil acesso a uma fita-molde (fase S/G2 do ciclo celular), a célula preferencialmente segue pela via HR, mais complexa porém menos propensa a erro. Quando não há a disponibilidade da fita-molde (G0/G1), a célula realiza a correção pela via NHEJ, mais simples porém muito mais propensa a erros. Adaptado de Hoeijmakers et al. (2001).

1.7 Genes de reparo de DNA em estudo

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo, através de experimentos de *PCR Array*, revelaram que os genes APEX1 (APEX Nuclease 1), BRCA2 (Breast Cancer 2), BRIP1 (BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1), EXO1 (Exonuclease 1), NEIL3 (Nei Endonuclease VIII-like), RAD54L (RAD54-like (*S. cerevisiae*)) e XRCC2 (X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2), todos envolvidos em vias de reparo de DNA, estão super-expressos em amostras de astrocitomas (Escanfella, 2012 – dado não publicado). Dados da literatura mostram ainda que a maioria destes genes tem associação com câncer ou resistência a agentes genotóxicos já relatadas, conforme descrito a seguir.

1.7.1 APEX1

O gene APEX1 codifica a principal AP endonuclease de mamíferos (APE1), uma enzima que reconhece sítios apurínicos ou apirimídicos gerados por glicosilases e cliva o DNA adjacente, portanto, essa enzima atua na via de reparo por BER (Moore et al., 2013; Timofeyeva *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2000) e interage com DNA glicosilases como NEIL1, NEIL2 e NEIL3. APE1 forma complexo estável com a glicosilase hMYH (Parker et al., 2001), com um co-fator da DNA polimerase δ (PCNA) e com a endonuclease FEN1 (Dianova et al., 2001), o que sugere que APE1 pode ser central no reparo por BER (Lucsford et al., 2013). APE1 medeia o reparo das lesões causadas por radiação ionizante e agentes alquilantes (Evans *et al.*, 2000; Mol *et al.*, 2000), limitando sua citotoxicidade, o que sugere sua participação na resistência dos gliomas a estes agentes (Bobola, 2001).

APE1 também atua como co-ativador transcricional juntamente com fatores de transcrição, como por exemplo p53 (Li *et al.*, 2011), e participa de outros processos celulares cruciais, incluindo a resposta ao estresse oxidativo, regulação de fatores de transcrição, controle do ciclo celular e apoptose (Bobola, 2001). A perda desse gene é letal durante o desenvolvimento embrionário em ratos (Xanthoudakis et al., 1996), enquanto que o silenciamento parcial em embriões de zebrafish leva ao desenvolvimento impróprio do coração e do tecido neural (Wang et al., 2006).

1.7.2 BRCA2

Estudos bioquímicos e moleculares mostraram que BRCA2 está envolvido na manutenção da estabilidade do genoma, especificamente na via de reparo de DNA dupla fita por recombinação homóloga (Moynahan et al., 2001), assim como BRCA1, e interage com

RAD51, RAD52 e RAD54 (Hoeijmakers, 2001). A herança de um alelo mutante de BRCA2 predispõe seus portadores ao câncer de mama de início precoce devido à perda da heterozigossidade, caracterizando esse gene como um supressor de tumor (Tavtigian *et al.*, 1996; Wooster *et al.*, 1995). Mutações no gene BRCA2 também aumentam o risco de desenvolvimento de câncer de ovário.

Quiros *et al.* (2011) demonstraram que o silenciamento de BRCA2 torna as células de gliomas mais sensíveis ao tratamento com quimioterápicos O6-alquilantes. Kote-Jarai *et al.* (2011) avaliaram o papel de BRCA2 na predisposição ao câncer de próstata por meio de rastreamento de 1832 casos, em homens entre 36-88 anos de idade, para busca de fragmentos em *heteroduplex*, utilizando um método de fluorescência de alto rendimento. Foram identificadas 19 mutações que truncam a proteína, 3 deleções em fase e 69 variações não sinônimas. Com base na frequência das mutações na população, concluiu-se que as mutações em BRCA2 conferem um risco 8,6 vezes maior de desenvolvimento de câncer de próstata aos 65 anos, o que corresponde a um risco absoluto de aproximadamente 15%. Em conjunto, estes dados mostram que BRCA2 está envolvida com o aumento de risco de câncer para vários tipos tumorais.

1.7.3 BRIP1

A proteína codificada pelo gene BRIP1 é da família das helicases e interage com o produto do gene BRCA1. Ambas as proteínas atuam no sistema de reparo por recombinação homóloga, sendo que a helicase codificada por BRIP1 separa as fitas de DNA onde há lesão permitindo que a proteína de BRCA1 encontre e corrija essa lesão. BRIP1 atua ainda na execução da checagem do DNA nas fases G2/M do ciclo celular e dá assistência na progressão das forquilha de replicação na fase S (Rafnar, 2011). Rafnar *et al.* (2011) descobriram uma mutação rara (com frequência de 0,41%) do tipo *frameshift* no gene BRIP1 que aumenta o risco de câncer ovariano (OR=8,13). Essa mutação foi também associada com aumento do risco de câncer em geral e redução do tempo de vida em 3,6 anos.

Foi visto também que linhagens de células tumorais que não expressam BRIP1 são extremamente sensíveis a agentes indutores de cross-link na dupla fita de DNA, como cisplatina e mitomicina C (Litman *et al.*, 2005; Levitus *et al.*, 2005; Levran *et al.*, 2005) e essa condição é revertida pela complementação com BRIP1 selvagem (Cantor *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2007; Wu & Brosh, 2009).

1.7.4 EXO1

O gene EXO1 codifica uma proteína com atividades de exonuclease 5' → 3' e RNase (Lee e Wilson, 1999) que participa da via de reparo MMR interagindo com a proteína MSH2 (Schmutte *et al.*, 1998). EXO1 se liga a nucleotídeos mal pareados e a bolhas de inserção/deleção geradas pelo pareamento errôneo (Acharya *et al.*, 1996). Sua atividade nucleásica é também necessária no reparo de quebras na dupla-fita de DNA através da ressecção das extremidades. Além da função enzimática, EXO1 apresenta funções estruturais independentes da função nucleásica que são requeridas na resposta a quebra de simples-fita de DNA mediada por MMR, maturação de anticorpos, processamento de quebras de dupla-fita de DNA mediada por NHEJ e meiose (Schaetzlein *et al.*, 2013).

1.7.5 NEIL3

NEIL1, NEIL2 e NEIL3 foram identificados como genes codificadores de proteínas da família das DNA glicosilases. NEIL1 e 2 apresentam uma robusta atividade liase enquanto NEIL3 se mostra fraca neste sentido. Sabe-se que dão início ao processo de reparo por excisão de bases, clivando a ligação N-glicosil de bases pirimidínicas lesadas pela ação de espécies reativas de oxigênio e por reação associada a liases, deixando um sítio abásico (AP) no DNA (Liu, 2013). NEIL3 atua preferencialmente em lesões simples-fita, sequências teloméricas e estruturas quadruplex de guanina formadas no telômero (Liu *et al.*, 2010, 2012 e 2013; Zhou *et al.*, 2013; Wallace, 2013).

A expressão deste gene parece ser regulada no ciclo celular (Neurauter *et al.*, 2012), mostra indução no início da fase S e seus maiores níveis aparecem na fase G2 (Neurauter *et al.*, 2012; Bar-Joseph *et al.*, 2012; Whitfield *et al.*, 2002), indicando que NEIL3 está envolvida no reparo associado a replicação. Além disso, já foi demonstrado que NEIL3 se localiza no núcleo e co-localiza com a proteína de replicação A (RPA) (Morland *et al.*, 2002). A indução de NEIL3 parece ser regulada pela via ERK-MAP dependente de Ras, enquanto sua repressão parece ser mediada pela ligação de E2F4 no complexo DREAM (DP1, RB p130, E2F4 e MuvB) (Neurauter *et al.*, 2012; Litovchick *et al.*, 2007; Cam *et al.*, 2004).

Quanto ao padrão de expressão, NEIL3 em geral é mais expresso em tecidos tumorais do que no tecido normal correspondente (Hildrestrand *et al.*, 2009). Em ratos, foi visto como altamente expresso em tecidos hematopoiéticos como baço, medula óssea, timo e em linhagens de células B de ratos (Morland *et al.*, 2002; Torisu *et al.*, 2005), oócitos, zigoto, e durante a organogênese e neurogênese (Hildrestrand *et al.*, 2009). Essa expressão

característica em células em proliferação indica que NEIL3 não está envolvido somente no reparo de danos oxidativos, ao contrário, deve desempenhar um papel fora da via canônica BER. Em um estudo recente, Reis e colaboradores (2012) demonstraram que a deficiência de NEIL3 provoca redução na capacidade de diferenciação de células tronco e na taxa de proliferação, além de aumento de sinais de senescência prematura. Há ainda evidências de que NEIL3 desempenha papéis relacionados ao sistema imune, uma vez que o seu silenciamento provoca redução no número de células brancas no sangue (Torisu et al., 2005) e reduz a infecção por HIV (Zhou et al., 2008).

1.7.6 RAD54L

RAD54L codifica uma ATPase DNA-dependente que desempenha um importante papel no reparo de DNA pela via de recombinação homóloga, ligando-se especificamente às junções *Holliday* e interagindo com RAD51, RAD52, BRCA1 e BRCA2. RAD54L é semelhante a RAD54 codificada por *Saccharomyces cerevisiae*, por isso foi nomeado RAD54-Like (Rossi & Mazin, 2008 e Hoeijmakers, 2001). Ruiz-Herrera et al. (2011) avaliaram as consequências do silenciamento de RAD54L em cultura de células normais. Os ensaios mostraram que as células se tornaram mais sensíveis à radiação gama e à ação de metotrexato, e sugerem que RAD54L desempenhe um importante papel na prevenção de rearranjos de centrômeros.

1.7.7 XRCC2

XRCC2 também codifica uma proteína que atua na via de reparo de DNA por recombinação homóloga (Krupa et al., 2011). Kondo e colaboradores (2010) analisaram a sensibilidade de fibroblastos embrionários deficientes para XRCC2, RAD54L e Lig4 (DNA Ligase IV) à ACNU (*[1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea]*). Observou-se que a recombinação homóloga é muito importante no reparo de lesões induzidas pela ACNU, diferentemente de resultados já obtidos para a temozolamida (Kondo et al., 2009), pois as lesões por ela induzidas são reparadas majoritariamente pela via NHEJ. Evidenciou-se ainda que células com XRCC2 nocauteado mostraram hipersensibilidade a outros agentes que causam lesões do tipo *cross-link*, como fotemustine, cisplatina e mitomicina C (Tsaryk et al., 2006). Outro trabalho conduzido por Zheng e colaboradores (2012) mostra que XRCC2 e XRCC4 são superexpressos em linhagens

celulares e amostras tumorais de GBM e o silenciamento destes genes sensibiliza as células tumorais à radioterapia.

Portanto, a superexpressão de APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 pode estar relacionada à alta resistência dos GBMs ao tratamento com agentes genotóxicos (químio e radioterapias), o que os torna bons candidatos a serem explorados como potenciais novos alvos terapêuticos. Para avançar na caracterização molecular dos genes em questão, avaliamos o seu padrão de expressão em um painel expandido de 54 casos clínicos de astrocitomas de diferentes graus de malignidade, com o intuito de avaliar se há uma correlação entre os níveis de expressão e prognóstico de sobrevida dos pacientes. Além disso, avaliamos ainda a expressão desses 7 genes em linhagens celulares de GBM, afim de elucidar qual delas seria a ferramenta mais adequada para nossos estudos subsequentes envolvendo ensaios funcionais de silenciamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de expressão dos genes de reparo APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 em um painel expandido de amostras de astrocitomas e selecionar dois deles para caracterização funcional envolvendo silenciamento gênico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o nível de expressão dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 em um painel expandido de casos de astrocitomas e correlacionar estes dados com a sobrevida dos pacientes;
- Avaliar o nível de expressão dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 nas células HDPC (fibroblastos não-tumorais), e nas linhagens de GBM U138, U251, U343, U87MG e T98G;
- Com base nos dados de expressão, selecionar dois genes e as linhagens celulares mais adequadas para os ensaios funcionais de silenciamento;
- Padronizar condições efetivas de silenciamento para os genes selecionados nas 3 linhagens celulares que serão utilizadas nos ensaios funcionais;
- Ensaios funcionais em células silenciadas ou não:
 - Avaliar a distribuição no ciclo celular através da análise do conteúdo de DNA;
 - Avaliar as taxas de apoptose e morte celular efetiva;
 - Avaliar as taxas de apoptose e morte celular efetiva após exposição à radiação ionizante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de tecido normal e tumoral

As amostras controle (substância branca não tumoral) que foram utilizadas na realização dos ensaios foram obtidas de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica para tratamento de epilepsia no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As amostras tumorais foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia para retirada dos tumores no mesmo hospital. Os fragmentos foram coletados no momento da cirurgia, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C até o momento do uso. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento e o projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (processo HCRP n. 7645/99).

Os fragmentos congelados foram microdissecados em criótomo pelo patologista responsável, para ressecção das áreas bem preservadas do tecido (sem necrose) e com as características histológicas de interesse (substância branca normal ou glioma). Os fragmentos microdissecados que confirmam o diagnóstico de interesse foram então mantidos em freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA das amostras foi extraído e avaliado para verificação de sua pureza e qualidade. A concentração e a pureza das amostras de RNA foi acessada através de leitura em espectrofômetro de luz UV para medida da absorbância (A) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. O valor médio da $A_{260/280}$ das amostras que foram utilizadas neste estudo é de 1,81 ($\pm 0,07$), o que reflete um bom grau de pureza. A integridade dos RNAs foi avaliada através da razão das intensidades das bandas 28S e 18S após eletroforese em gel de agarose desnaturante. As amostras que foram utilizadas neste estudo apresentaram razão entre as bandas $28/18\text{S} > 1,7$.

3.2 Avaliação do nível de expressão dos genes

Foi utilizado 1 μg de RNA total de cada uma das amostras para síntese dos cDNAs. O RNA foi inicialmente tratado com DNaseI (Invitrogen®) na presença de inibidor de RNase (RNase Inhibitor, Applied Biosystems®) e em seguida submetido à transcrição reversa com o kit High Capacity (Applied Biosystems®), seguindo as especificações dos fabricante. Para a realização da reação de PCR quantitativo foi desenhado um par de *primers* para cada gene cujas sequências constam na Tabela 1. A reação foi procedida utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems®). Neste método os *amplicons* são marcados no momento da síntese e a emissão de fluorescência que ocorre durante a formação de duplas-

fitas permite a estimativa dos níveis de mRNA alvo nas células estudadas. Todas as reações de RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram feitas em duplicata. Os valores de C_T (*cycle threshold*) gerados e processados pelo software do equipamento (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems®) foram exportados para o Microsoft Excel® e as quantidades relativas foram calculadas pelo método do 2^{-DDCt} (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores de C_t dos genes de interesse observados nas amostras foram normalizados com os resultados obtidos para o genes HPRT, cujo padrão de expressão não apresenta diferença significativa entre células humanas normais e tumorais (Valente et. al., 2009).

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR.

Gene	Sequência forward	Sequência reverse
APEX1	5'-GGAATGCCGAAGCGTGGGAA-3'	5'-CCTCTCCTGCTGCCTCTTTG-3'
BRCA2	5'-CAGGGCCGTACACTGCTCAA-3'	5'-GGGCTGAGACAGGTGTGGAA-3'
BRIP1	5'-CCAGACTGTGAGCCAAGGAA-3'	5'-CTCCTCCCTGTGGTTCTACA-3'
EXO1	5'-CCAGACCTCCAAGCTACGTT-3'	5'-TCTGGCAGGTCCTAGAGGTT-3'
NEIL3	5'-TGGTCTCCACCCAGCTGTTA-3'	5'-CCTGCTTTACGGCACCTGTA-3'
RAD54L	5'-GGGTCTGGCGAGATGGTCAA-3'	5'-CCACCACACAGCTGCTCAGT-3'
XRCC2	5'-CCTTGCCCGACTTGAAGGTA-3'	5'-CTGTTCTTCTGGGCCATGA-3'

3.3 Análise estatística e relação dos perfis de expressão com dados clínicos

O cálculo do 2^{-DDCt} permite a estimativa da quantidade relativa de cDNA, ou seja, estima-se a quantidade de mRNA de cada gene presente nas diferentes amostras tumorais e nas linhagens celulares em relação ao padrão de expressão normal (controle), que nesse caso foi obtido nas reações feitas com a linhagem não-tumoral (HDPC) e com amostras de substância branca normal (SB).

Com os dados obtidos nas reações realizadas e após o cálculo do 2^{-DDCt} , procedeu-se as análises estatísticas: com os resultados das linhagens celulares foi feita uma análise de variância com o software “GraphPad Prisma 5.0”, utilizando o teste de Tukey (ANOVA) que compara os grupos dois a dois entre si e com o controle; Para avaliar os resultados das amostras tumorais foi feito o teste não paramétrico bicaudal de Mann-Whitney (ANOVA), através do mesmo software. Os dados de expressão relativa de 54 amostras de casos clínicos foram ainda utilizados para estimação não paramétrica da função de sobrevivência em relação aos perfis de expressão encontrados, com a finalidade de se traçar uma possível correlação dos perfis de expressão de cada gene com o prognóstico dos pacientes.

3.4 Ensaio funcional de silenciamento

3.4.1 Cultivo celular e transfecção

As linhagens celulares utilizadas foram: HDPC, uma cultura primária de fibroblasto não-tumoral isolado de polpa dentária na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP) e gentilmente cedida pelos Professores Dr Carlos Alberto de Souza Costa e Dr Josimeri Hebling e, T98G, U138MG, U343MG, U87MG e U251, todas de GBM foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr Carlos Gilberto Carlotti Jr (FMRP-USP). As células foram cultivadas em DMEM acrescido de 10% SFB até 70% de confluência para realização do ensaio de silenciamento. Os oligos de RNA para o silenciamento (siRNA) foram desenhados conforme o gene alvo selecionado e, para fins de controle, foi feito ainda o silenciamento das linhagens com uma sequência de siRNA que não possui mRNA-alvo em células humanas (Tabela 2). Nesta metodologia, é feita a introdução de oligonucleotídeos curtos de RNA dupla fita nas células eucarióticas utilizando vesículas lipídicas artificiais (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen®), que se fundem com a membrana celular entregando o seu conteúdo no citoplasma. Para conduzir este experimento, foi utilizada uma microplaca de 24 poços. Adicionou-se 0,4µL dos oligonucleotídeos (solução a 10 µM), dirigidos para o RNA de interesse ou controle de sequência aleatória, em 80µL de meio Opti-MEM (Gibco®) e homogeneizou-se a mistura. Em seguida, foi adicionado 0,8µL de lipofectamina em cada poço e a mistura foi homogeneizada novamente e deixada em repouso por 20 minutos. Após o repouso, 320µL da suspensão celular com 2×10^4 células/mL foi gotejada lentamente nos poços sobre o meio contendo os complexos de lipossomas e siRNA já formados. A microplaca foi tampada, homogeneizada e incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, 200µL do meio de transfecção foi trocado e a placa incubada novamente por 48 horas.

Tabela 2. Sequências de siRNAs desenhadas para cada gene em estudo.

Gene	Sequência sense	Sequência antisense
EXO1	5'-AAGGCAAUAAAUCAUUGAGTT-3'	5'-CUCAAUGAUUUUAUUGCCUUTT-3'
NEIL3	5'-AAGGCAUGUGAUGCUUGCUTT-3'	5'-AGCAAGCAUCACAUGCCUUTT-3'
Controle	5'-AAGCUAUUCCGCAAUCAGGTT-3'	5'-CCUGAUUGCGGAUAGCUUTT-3'

3.4.2 Análise de eficiência do silenciamento

Foram analisados os níveis de mRNA de cada gene alvo nas células transfectadas através qRT-PCR. A extração do RNA das células foi realizada com o reagente Trizol (Ambion®). Posteriormente, foi feita a reação de transcrição reversa com o kit High Capacity (Applied Biosystems®), seguindo as especificações dos fabricante. O cDNA resultante foi utilizado como molde para amplificação em reações de PCR quantitativo com primers específicos para os genes selecionados, bem como HPRT para fins de controle, e o reagente SYBR Green (Applied biosystems®).

3.5 Análise de ciclo celular pela avaliação do conteúdo de DNA

2, 3 ou 5 dias após o plaqueamento e transfecção, as células foram tripsinizadas da placa e transferidas para tubos de 1,5mL e centrifugadas. O *pellet* foi lavado com 800µL de PBS1x-EDTA 5mM e ressuspensas em 300µL de PBS1x-EDTA 5mM. Posteriormente, foram adicionados 700µL de etanol absoluto gelado por meio de gotejamento leve e incubou-se a -20°C *overnight* para fixação das células. Em seguida, foi feita uma centrifugação, o etanol foi descartado e as células novamente ressuspensas em PBS1x-EDTA 5mM (112,5µL) e tratadas com RNase A (1mg/mL) durante 30 minutos a 37°C. Por fim, adicionou-se 125µL de iodeto de propídio (100 µg/mL) e realizou-se então a leitura no citômetro de fluxo (FACSCanto, BD®). O dado obtido foi analisado no programa “ModFit”.

3.6 Avaliação de apoptose e morte celular

4 ou 7 dias após plaqueamento e transfecção e 4 dias após a transfecção sob efeito de radiação ionizante (14Gy de raios X – RadSource 2000, Biological System®), as células foram tripsinizadas da placa e transferidas para tubos de 1,5mL e centrifugadas. Em seguida, o *pellet* foi lavado com PBS 1x e ressuspensado em uma mistura de anexina V – Alexa 488 (Molecular Probes®) e tampão de ligação (1µl de anexina: 100µl de tampão). No momento da leitura no citômetro de fluxo foi adicionado 1µl de iodeto de propídeo (0,1mg/ml). Essa metodologia fornece uma análise quantitativa dos níveis de apoptose e morte celular através da marcação com anexina e iodeto de propídeo, respectivamente. O fosfolípido fosfatidilserina, que é reconhecido pela anexina, é normalmente mantido na face interna da bicamada lipídica da membrana, sendo exteriorizado apenas quando a célula entra em apoptose. Desse modo, a quantificação da marcação com anexina, que está conjugada a um fluoróforo específico (Alexa Flúor-488), fornece uma estimativa da quantidade de células em apoptose.

O iodeto de propídeo marca as células mortas, uma vez que estas já perderam totalmente o controle de permeabilidade da membrana, permitindo assim a entrada das moléculas de iodeto. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, BD®) para determinação da porcentagem de células marcadas na população.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos níveis de expressão dos genes de reparo selecionados em astrocitomas

A avaliação da expressão dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 foi expandida para 54 amostras de casos clínicos de astrocitomas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sendo 6 amostras de ASTII, 6 amostras de ASTIII e 42 amostras de GBM. Foram também analisadas 9 amostras de substância branca não tumoral (SB), que utilizamos como referência de expressão normal. A estimativa de expressão relativa (2^{-DDCt}) foi feita comparando-se os valores de C_T normalizados das amostras tumorais com a mediana das amostras SB. Os valores de expressão relativa de cada caso avaliado são mostrados na Tabela 3. Quando verificamos o número de casos observados em cada intervalo de *fold change*, notamos uma maior frequência nas faixas de expressão até 10 vezes para os genes APEX1, RAD54L e XRCC2, nas faixas entre 10 e 60 vezes para os genes BRCA2 e BRIP2, e nas faixas acima de 60 vezes para os genes EXO1 e NEIL3 (Tabela 4). Observamos também que o *fold change* médio na expressão relativa dos genes para cada grau tumoral é expressivamente maior para os genes EXO1 e NEIL3 (Tabela 3). Estes dados revelam que dentre os genes avaliados EXO1 e NEIL3 são os que apresentam os maiores níveis de expressão nas amostras tumorais e os indicam como bons alvos para os ensaios funcionais seguintes.

As faixas de expressão relativa obtidas para cada gene nos diferentes grupos experimentais foram plotadas nos gráficos descritos a seguir (Figura 8). Quando comparados à SB, todos os grupos tumorais apresentaram níveis de expressão relativa significativamente maiores para os genes avaliados, excetuando-se apenas o gene RAD54L em amostras de AST II (Figura 8F). Na análise dos genes APEX1, RAD54L e XRCC2 observou-se uma variação de *fold change* de 2 a 10 vezes, ou seja, esses genes estão de duas a dez vezes mais expressos nas amostras tumorais do que na SB (Tabela 3 e Figura 8A, F e G). A expressão do gene RAD54L não foi detectada em 3 amostras do grupo ASTII (Tabela 3), o que explica o fato de RAD54L não estar superexpresso neste grupo. Os genes BRCA2 e BRIP1 mostraram *fold change* variando entre 5 e 60 vezes (Tabela 3 e Figura 8B e C). Conforme mencionado anteriormente, EXO1 e NEIL3 mostraram os níveis de superexpressão mais acentuados, situando-se no intervalo de *fold change* de 20 a >100 (Tabela 3 e Figura 8D e E). Comparando-se os grupos tumorais entre si, houve diferenças significativas somente na

comparação entre os padrões de expressão do gene NEIL3 nas amostras de ASTII e GBM (P<0,03 – Figura 8E).

Tabela 3. Dados de expressão relativa de mRNA observados para cada paciente e cada gene avaliado. São apresentadas as médias e medianas para cada gene de acordo com o grupo tumoral.

REGISTRO	GRUPO	Expressão relativa de mRNA							SOBREVIDA (DIAS APÓS O DIAGNÓSTICO)
		APEX1	BRCA2	BRIP1	EXO1	NEIL3	RAD54L	XRCC2	
SNC 02	ASTII	1,594	2,215	4,326	4,836	4,887	0,416	1,206	DNO
SNC 08	ASTII	1,947	11,546	64,047	57,559	85,660	5,953	7,288	1011
SNC 220	ASTII	0,607	0,909	12,474	39,613	30,557	0,343	1,406	728
SNC 250	ASTII	15,983	6,210	21,408	27,951	28,464	5,001	13,350	1499
SNC 482	ASTII	6,283	22,541	94,445	87,888	64,675	12,028	7,864	331
SNC 573	ASTII	2,225	1,711	1,681	2,099	1,453	1,169	2,254	DNO
SNC 71	ASTIII	1,886	14,239	45,797	83,652	116,109	5,011	10,463	812
SNC 85	ASTIII	1,259	3,802	14,301	19,220	19,754	1,766	1,160	270
SNC 169	ASTIII	8,540	31,295	57,503	83,548	177,144	16,631	21,059	344
SNC 234	ASTIII	9,098	13,692	4,554	22,050	4,007	3,242	8,319	1654
SNC 243	ASTIII	0,460	6,958	40,347	72,949	65,704	3,586	4,776	123
SNC 389	ASTIII	144,667	3,748	390,761	933,335	357,570	97,891	134,128	14
SNC 87	GBM	1,886	14,239	45,797	83,652	116,109	5,011	10,463	271
SNC 01	GBM	1,596	12,793	66,357	92,781	180,843	7,097	8,977	389
SNC 06	GBM	1,651	17,866	18,574	204,513	97,137	3,839	3,764	73
SNC 14	GBM	0,944	5,096	53,383	94,043	151,757	4,230	11,937	376
SNC 96	GBM	1,584	11,799	62,646	106,120	133,615	6,902	4,831	6
SNC 114	GBM	1,002	5,979	6,952	16,517	11,461	1,042	1,408	374
SNC 134	GBM	1,222	1,759	9,375	9,459	15,312	0,872	1,268	1111
SNC 159	GBM	1,914	5,275	18,637	14,858	17,859	1,778	2,607	85
SNC 174	GBM	1,511	7,336	43,537	113,377	162,836	4,175	8,539	189
SNC 179	GBM	1,587	9,585	28,373	67,104	113,616	4,030	5,395	8
SNC 184	GBM	1,151	4,962	9,764	14,841	24,809	1,049	2,970	99
SNC 187	GBM	1,559	16,945	64,635	86,756	164,719	7,526	8,623	175
SNC 191	GBM	2,313	46,363	88,398	329,698	350,920	2,167	15,662	405
SNC 198	GBM	1,669	7,288	26,308	61,814	95,223	3,233	3,338	171
SNC 199	GBM	0,845	4,891	20,300	31,356	55,853	1,576	2,161	155
SNC 219	GBM	5,484	11,926	16,896	1,827	40,812	6,657	5,890	141
SNC 224	GBM	0,242	0,255	1,253	1,324	4,121	0,309	0,505	94
SNC 228	GBM	4,077	9,822	14,266	21,302	11,176	1,926	3,890	2910
SNC 238	GBM	2,164	12,913	43,893	67,804	114,260	4,133	4,482	184
SNC 240	GBM	3,426	10,898	54,652	90,919	54,386	5,311	6,646	542
SNC 241	GBM	1,551	10,424	51,847	93,474	68,325	4,229	6,191	DNO
SNC 244	GBM	3,206	10,077	46,891	63,118	49,595	4,166	11,437	14
SNC 245	GBM	4,158	10,549	60,514	62,356	44,874	4,441	6,612	2587

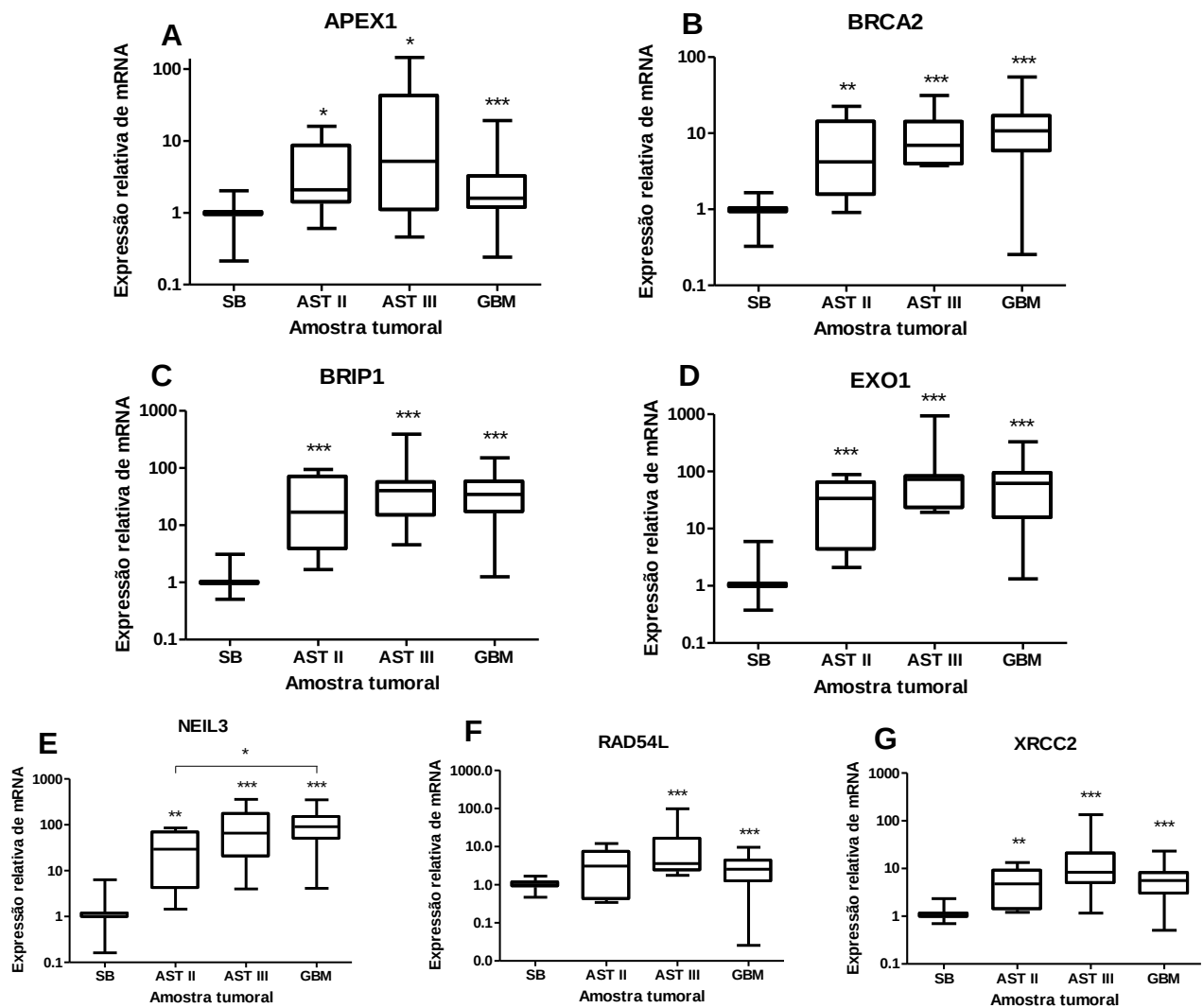
Continua

									Continuação
REGISTRO	GRUPO	APEX1	BRCA2	BRIP1	EXO1	NEIL3	RAD54L	XRCC2	SOBREVIDA
SNC 290	GBM	1,111	4,267	9,475	7,420	17,180	0,949	1,803	93
SNC 307	GBM	2,429	12,781	46,594	69,156	108,545	5,285	6,303	261
SNC 311	GBM	1,809	17,397	58,088	32,111	39,671	2,535	0,036	351
SNC 321	GBM	1,516	54,849	129,780	246,424	303,384	5,453	17,851	312
SNC 322	GBM	8,112	11,960	25,423	11,320	230,882	7,428	8,112	72
SNC 323	GBM	0,880	25,106	40,173	128,890	121,938	2,435	5,588	371
SNC 357	GBM	1,083	12,111	32,984	40,645	90,824	2,110	5,015	281
SNC 437	GBM	1,676	12,467	23,402	26,264	50,563	0,600	0,943	45
SNC 447	GBM	1,586	17,204	68,726	97,681	69,551	0,316	0,901	130
SNC 458	GBM	0,582	4,535	10,681	9,613	82,139	0,026	4,063	62
SNC 465	GBM	7,184	5,491	14,904	14,468	93,170	1,972	7,184	18
SNC 471	GBM	1,361	19,438	78,581	71,012	153,277	1,263	6,507	121
SNC 485	GBM	1,711	5,669	36,051	263,197	61,181	0,739	5,583	39
SNC 488	GBM	1,021	17,540	27,564	56,886	68,832	1,304	4,453	80
SNC 521	GBM	1,283	13,891	47,530	41,212	49,180	0,001	12,782	138
SNC 590	GBM	7,004	9,399	9,641	14,326	91,358	3,511	7,004	660
SNC 647	GBM	0,871	25,227	60,205	108,383	242,191	0,844	1,417	53
SNC 727	GBM	5,818	6,473	17,904	8,012	134,294	4,345	5,818	294
SNC 906	GBM	3,850	27,076	150,376	295,088	223,635	0,006	23,175	265
SNC 928	GBM	19,131	1,045	9,850	23,442	155,189	9,543	19,131	214
Média	ASTII	4,773	7,522	33,063	36,657	35,949	4,152	5,561	
	ASTIII	27,652	12,289	92,210	202,459	123,381	21,354	29,984	
	GBM	2,715	12,860	40,725	76,618	103,874	3,171	6,541	
Mediana	ASTII	2,086	4,213	16,941	33,782	29,511	3,085	4,771	
	ASTIII	5,213	10,325	43,072	78,248	90,906	4,298	9,391	
	GBM	1,596	10,898	36,051	62,356	91,358	2,535	5,588	

*DNO: dado não obtido

Tabela 4. Número de amostras de astrocitoma com expressão significativamente al-terada em cada intervalo de expressão, quando comparadas com substância branca não-tumoral (SB).

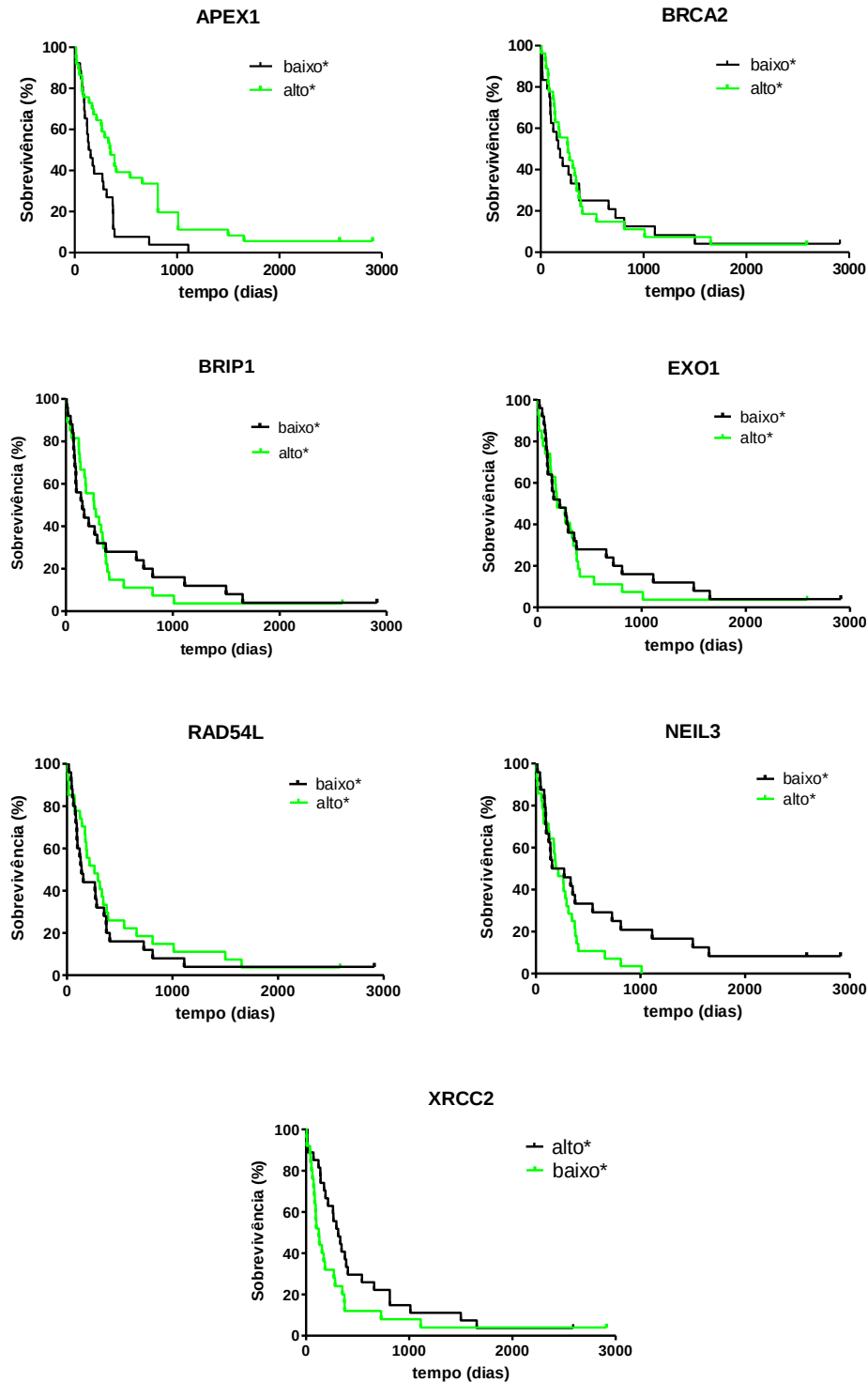
tumor/SB intervalo de variação da expressão	GENE						
	APEX1	BRCA2	BRIP1	EXO1	NEIL3	RAD54L	XRCC2
2 – 5	9	7	2	2	3	19	12
5 – 10	4	14	6	4	0	12	21
10 – 20	1	22	9	7	6	2	8
20 – 60	0	7	23	13	12	0	2
60 – 100	0	0	10	17	13	1	0
> 100	1	0	3	10	20	0	1
TOTAL	15	50	53	53	54	34	44

Figura 8. Expressão relativa de mRNA dos 7 genes em estudo.

Níveis de expressão relativa do mRNA dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 em amostras de substância branca não tumoral (SB, n=9), astrocitoma de grau II (ASTII, n=6), astrocitoma de grau III (ASTIII, n=7) e glioblastoma multiforme (GBM, n=42), avaliados por RT-PCR quantitativo. As caixas representam a faixa de expressão relativa com a mediana indicada. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,0001 em comparação com SB, teste de Mann-Whitney. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”.

Com base no valor da mediana de 2^{-DDCt} , para cada gene avaliado as amostras tumorais foram separadas em dois grupos: alto ou baixo índice de superexpressão. Com esses dados foram feitos os gráficos de sobrevida dos pacientes para cada um destes grupos (Figura 9). Nesta análise 3 amostras foram excluídas porque não tivemos acesso aos dados de sobrevida. A análise desses resultados mostrou que o padrão de expressão de cada gene, individualmente, não é preditivo de morte, ou seja, a alta ou baixa taxa de expressão desses genes isoladamente não influencia significativamente a sobrevida dos pacientes.

Figura 9. Curvas de sobrevida de pacientes com glioma com base na expressão dos genes em estudo.



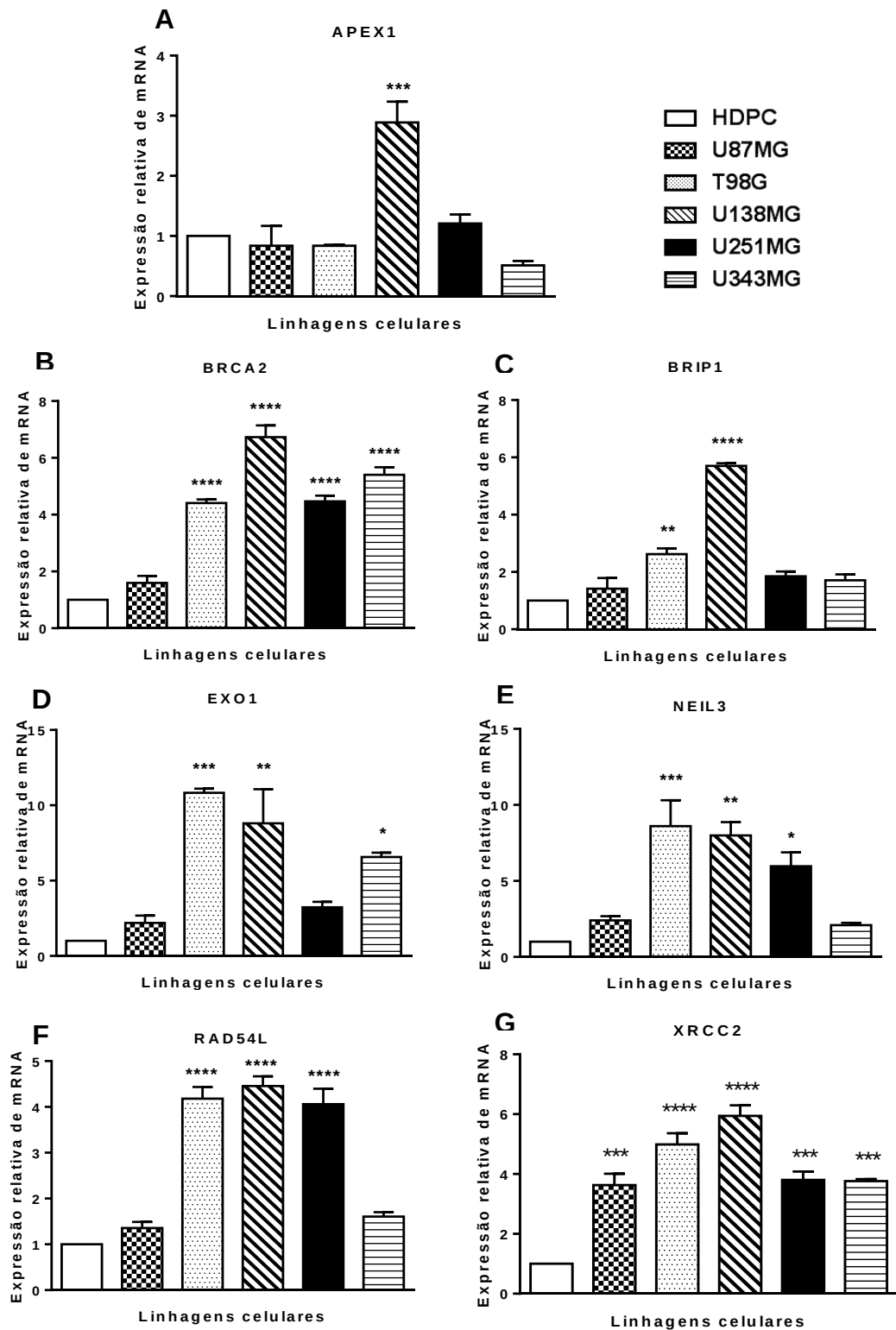
Curvas Kaplan-Meier de sobrevida para pacientes com astrocitoma de diferentes graus de malignidade de acordo com a expressão dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2. Os pacientes foram divididos em dois grupos: i) quantidades relativas abaixo da mediana e ii) quantidades relativas acima da mediana. *A diferença entre as curvas não foi significativa. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”.

4.2 Avaliação dos níveis de expressão dos genes de reparo selecionados em linhagens celulares de GBM

O padrão de expressão dos genes em estudo foi avaliado nas linhagens celulares HDPC, fibroblasto não-tumoral e U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG de GBM através de reações de qRT-PCR. Observamos que o gene APEX1 apresentou-se subexpresso apenas na linhagem U138MG (Figura 10A). BRCA2 foi significativamente mais expresso nas linhagens T98G, U138MG, U251 e U343 (Figura 10B). O gene BRIP1 foi significativamente mais expressos apenas nas linhagens T98G e U138MG (Figura 10C). EXO1 mostrou expressão aumentada em T98G, U138MG e U343MG (Figura 10D). NEIL3 e RAD54L foi significativamente mais expresso nas linhagens T98G, U138MG e U251 (Figura 10E e F). XRCC2 mostrou-se mais expresso em todas as linhagens tumorais (Figura 10G). A Tabela 5 sumariza numericamente os dados de razão de expressão observados em cada análise realizada. Notavelmente, as linhagens T98G e U138MG apresentaram expressão significativamente maior para todos os genes avaliados, excetuando-se apenas APEX1.

Tabela 5. Expressão relativa (fold change) média dos genes em estudo nas linhagens celulares, quando compara-das com a linhagem não tumoral (HDPC)

Linhagem celular/HDPC	GENE						
	APEX1	BRCA2	BRIP1	EXO1	NEIL3	RAD54L	XRCC2
U87MG	0,84	1,6	1,42	2,2	2,41	1,35	3,63
T98	0,84	4,41	2,62	10,83	8,6	4,18	4,99
U138	2,89	6,73	5,7	8,8	7,99	4,45	5,94
U251	1,21	4,47	1,85	3,23	5,97	4,06	3,8
U343	0,52	5,4	1,71	6,57	2,09	1,6	3,76

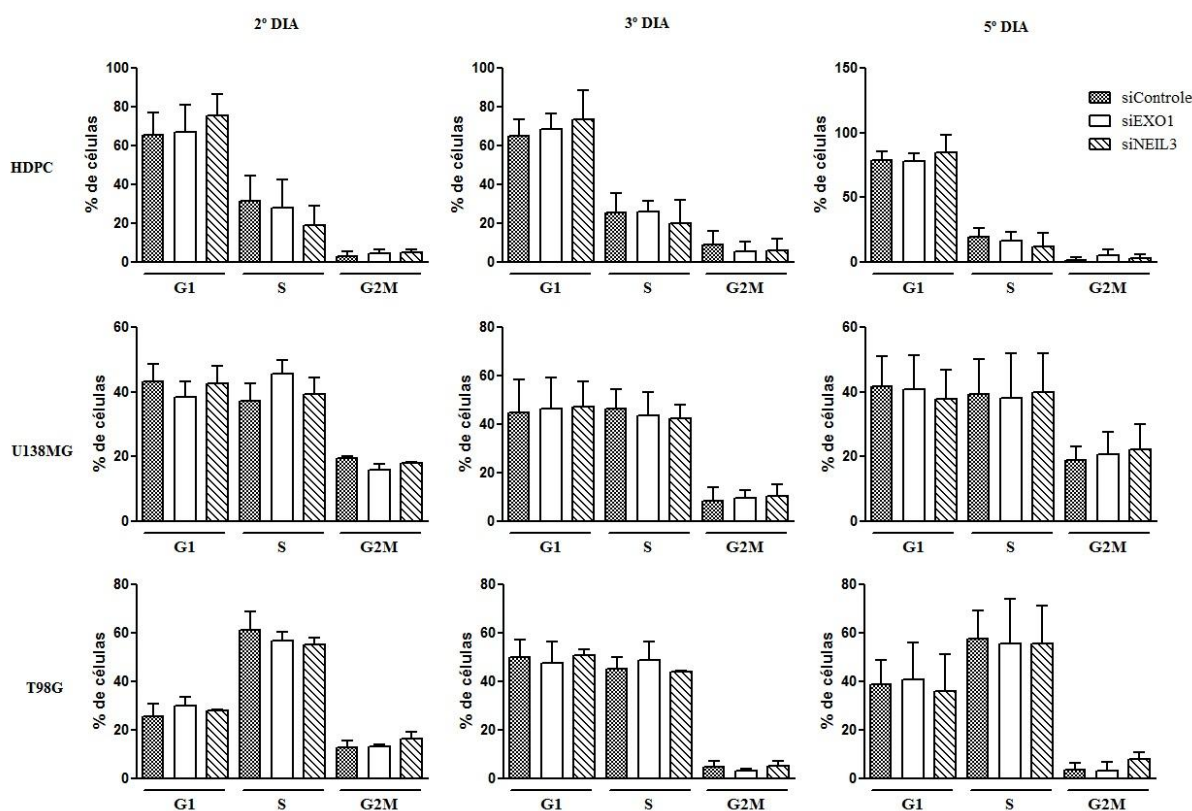
Figura 10. Expressão relativa dos genes em estudos em linhagens celulares.

Níveis de expressão relativa do mRNA dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 nas linhagens celulares HDPC, U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG, avaliados por RT-PCR quantitativo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$ e **** $P < 0,00001$ em comparação com HDPC. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”.

4.3 Distribuição das células HDPC, T98G e U138MG no ciclo celular após o silenciamento de EXO1 ou NEIL3

A distribuição das células no ciclo celular foi avaliada nas linhagens HDPC, T98G e U138MG 2, 3 e 5 dias após o silenciamento de EXO1 ou NEIL3, através de ensaios de citometria de fluxo (FACSCanto BD[®]). Observou-se que o silenciamento de EXO1 ou NEIL3 não provoca alterações na distribuição das células no ciclo. Os dados obtidos são mostrados na Figura 11 e as porcentagens médias de células em cada fase do ciclo estão sumarizadas na Tabela 6.

Figura 11. Avaliação da distribuição de células silenciadas ou não no ciclo celular.



Porcentagem de células U138MG e T98G em cada fase do ciclo celular 2, 3 ou 5 dias após a transfecção dos siRNAs controle ou dirigidos para EXO1 ou NEIL3. * $P < 0,05$. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”.

Tabela 6. Porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular 2, 3 ou 5 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3.

		siControle			siEXO1			siNEIL3		
		G1	S	G2/M	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
HDPC	DIA 2	65,69	31,42	2,89	67,33	28,20	4,47	75,81	19,17	5,02
	DIA 3	65,04	28,14	6,82	65,75	28,06	6,20	72,54	22,46	5,01
	DIA 5	78,93	19,45	1,62	77,93	16,44	5,63	84,73	12,00	3,26
U138MG	DIA 2	43,18	37,39	19,43	38,58	45,59	15,83	42,69	39,33	17,98
	DIA 3	44,87	46,53	8,59	46,51	43,83	9,66	47,27	42,40	10,34
	DIA 5	41,70	39,34	18,95	41,00	38,25	20,75	37,80	39,91	22,29
T98G	DIA 2	25,69	61,31	13,00	30,08	56,74	13,19	28,24	55,16	16,60
	DIA 3	50,00	45,30	4,68	47,86	49,01	3,13	50,73	44,19	5,09
	DIA 5	38,71	57,81	3,48	40,78	55,85	3,37	36,09	55,82	8,09

4.4 Avaliação da viabilidade das células HDPC, T98G e U138MG após silenciamento de EXO1 ou NEIL3

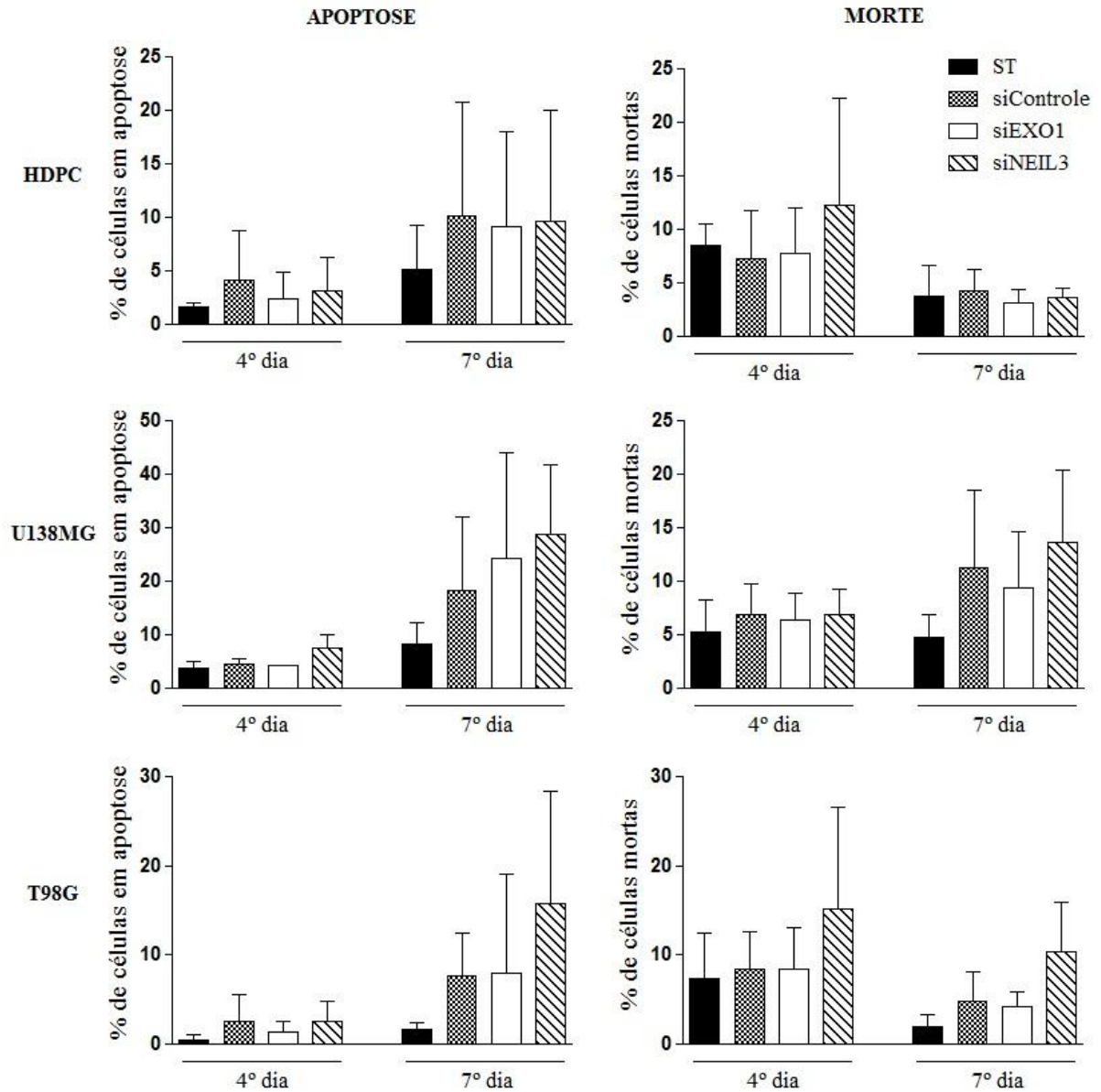
Através de ensaios de citometria de fluxo (FACSCanto BD[®]), a viabilidade celular foi avaliada nas linhagens celulares T98G e U138MG 4 ou 7 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3, e ainda, 4 dias após a transfecção sob efeito de radiação ionizante. Observando os resultados obtidos, percebe-se que o silenciamento de ambos os genes não induz aumento significativo nas taxas de apoptose e/ou morte celular nas células U138MG e T98G. E ainda, o silenciamento de ambos os genes não sensibiliza as células à radiação ionizante. As porcentagens de células viáveis, apoptóticas e mortas obtidas para cada condição avaliada são apresentadas na Tabela 7 e nas Figuras 12 e 13.

Tabela 7. Porcentagem média de células viáveis, apoptóticas e mortas 4 ou 7 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3 e 4 dias após a transfecção sob efeito de radiação ionizante.

		siControle			siEXO1			siNEIL3		
		V	A	M	V	A	M	V	A	M
HDPC	dia 4 não IR	81,15	9,68	9,17	79,65	10,53	9,80	72,32	13,95	13,67
	dia 4 IR	80,42	4,88	14,70	84,10	4,02	11,90	79,97	6,32	13,70
	dia 7	85,60	10,10	4,27	87,80	9,08	3,10	86,83	9,58	3,57
U138MG	dia 4 não IR	88,33	4,80	6,90	89,50	4,15	6,33	85,63	7,53	6,83
	dia 4 IR	82,93	10,02	7,07	81,90	8,52	9,57	82,10	8,43	9,47
	dia 7	70,45	18,35	11,20	66,49	24,16	9,43	57,73	28,68	13,61
T98G	dia 4 não IR	89,73	4,22	6,03	90,65	2,18	7,20	85,78	2,40	11,82
	dia 4 IR	87,58	5,33	7,13	86,45	1,68	11,85	80,97	2,12	16,90
	dia 7	87,56	7,63	4,86	87,83	7,95	4,23	74,03	15,69	10,29

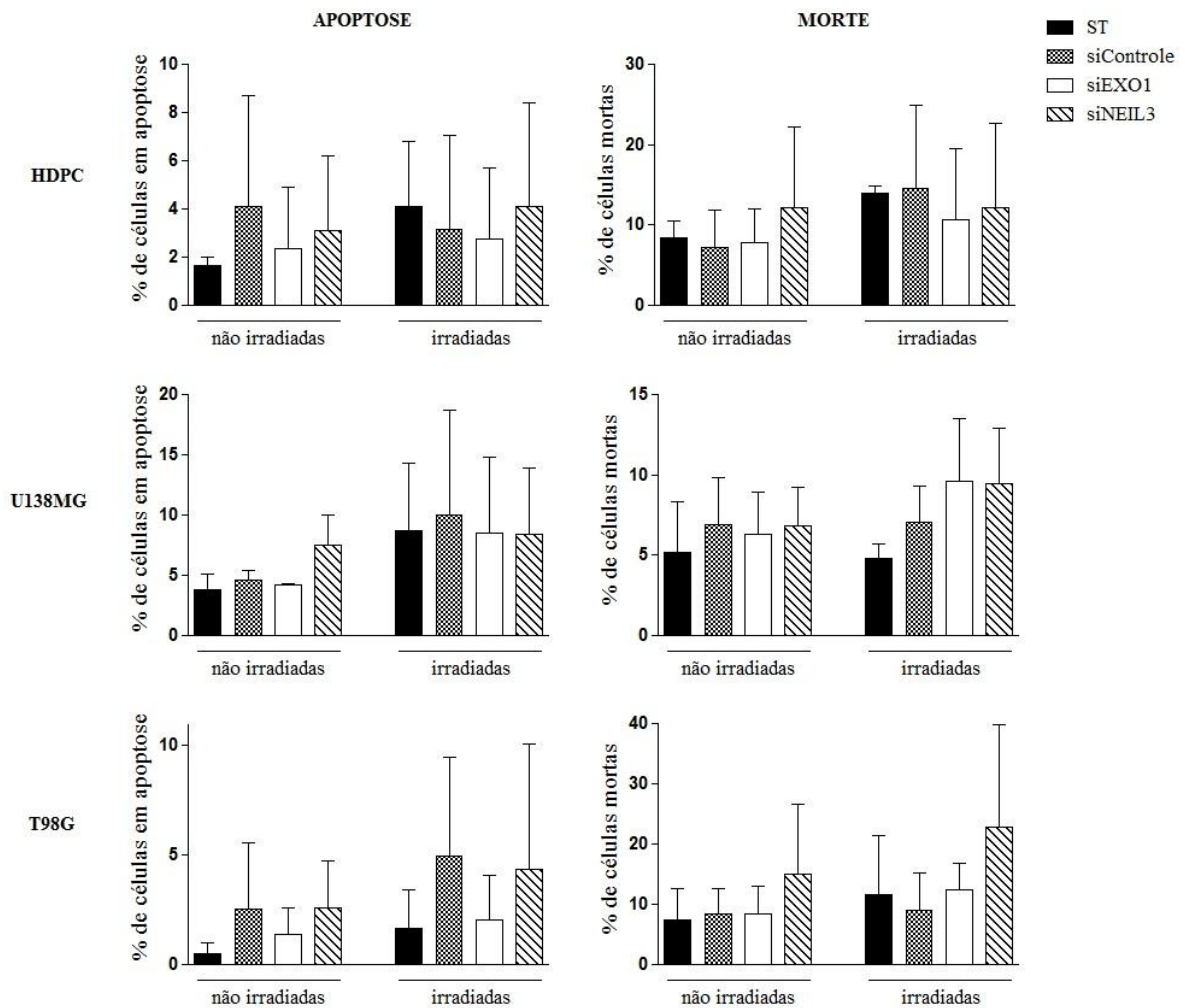
IR: irradiado; V: viável; A: apoptose; M: morte

Figura 12. Avaliação do efeito do silenciamento de EXO1 e NEIL3.



Porcentagem de células U138MG e T98G apoptóticas e mortas 4 ou 7 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3. * $P < 0,05$. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”. ST: sem tratamento.

Figura 13. Avaliação do efeito da radiação ionizante em células silenciadas.



Porcentagem de células U138MG e T98G apoptóticas e mortas 4 dias após a transfecção com siControle, siEXO1 ou siNEIL3 submetidas ou não à radiação ionizante. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$. Os gráficos foram plotados com o software “GraphPad Prism 5.0”. ST: sem tratamento.

5 DISCUSSÃO

A caracterização molecular de gliomas pode ajudar a identificar fatores causais da doença através da categorização refinada, ou seja, identificar padrões de comportamento gênico e estabelecer correlações com a biologia da tumorigênese e o crescimento sustentado do tumor. Além disso, é de suma importância a identificação de vulnerabilidades moleculares que possam representar novos alvos terapêuticos para melhorar o controle da doença e a qualidade de vida dos pacientes (Wiencke et al., 2005; Huse et al., 2012).

Neste sentido avaliamos o padrão de expressão dos genes de reparo de DNA APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 em amostras de astrocitomas de diferentes graus e sua possível correlação com o prognóstico de sobrevida dos pacientes. Observou-se que em maior ou menor grau todos esses genes são superexpressos nos astrocitomas. Notavelmente, EXO1 e NEIL3 mostraram os níveis de expressão mais discrepantes, tendo sido portanto escolhidos para ensaios funcionais envolvendo silenciamento gênico. Entretanto, isoladamente nenhum deles mostrou correlação dos níveis de expressão com a sobrevida dos pacientes. A literatura comprova que é raro que a expressão um único gene seja um fator confiável de predição de prognóstico dos pacientes. Entretanto, quando analisados em conjuntos a capacidade de predição aumenta. Com base no poder preditivo de sobrevida, Tayrac e colaboradores (2011) identificaram e validaram um modelo de contagem de risco baseado na expressão de 4 genes: CHAF1B, PDLIM4, EDNRB e HJURP. Foi visto que a superexpressão de CHAF1B, PDLIM4 e HJURP e a sub-expressão de EDNRB simultaneamente caracterizam uma assinatura gênica que apresenta forte correlação com pior prognóstico e sobrevida reduzida dos pacientes com glioma de alto grau. Portanto, buscaremos por novas assinaturas gênicas, relacionadas à sobrevida de pacientes com GBM, considerando os 7 genes analisados neste estudo conjuntamente e em combinações variadas.

APEX1 já foi descrito como superexpresso em diferentes tipos de câncer como: câncer de cabeça e pescoço (Mahjabeen et al., 2013), osteossarcomas (Yang et al., 2010), câncer pancreático (Jiang et al., 2010), pulmonar (Wu et al., 2010), ovariano, gastro-esofageano e pancreático-biliar (Al-Attar et al., 2010). E, no caso de câncer pulmonar (Puglisi et al., 2001), ovariano (Moore et al., 2000), tireoideano (Russo et al., 2001; Tell et al., 2000) e de mama (Puglisi et al., 2002), a expressão aumentada de APEX1 tem sido associada com maior agressividade do tumor (Tell et al., 2005). Estes dados estão concordam com nossas observações e apoiam que a superexpressão de APEX1 esteja relacionada com o desenvolvimento do câncer e, possivelmente, a resistência das células tumorais.

Das alterações que predisõem ao câncer, as de BRCA2 são algumas das mais importantes, conhecidas e bem caracterizadas, embora sejam de média prevalência (Majdak et al., 2005). A superexpressão de BRCA2 foi observada em metástase de adenocarcinoma de mama em linfonodos de cães (Klopffleisch and Gruber, 2009). Porém, em câncer humano, nossos dados parecem pioneiros pois há escassez de estudos que correlacionem a superexpressão de BRCA2 à tumorigênese e progressão tumoral.

Estudos recentes mostram evidências da relação do gene BRIP1 com o câncer de mama (Pennington & Swisher, 2012), sendo que este tipo tumoral apresenta maior expressão de BRIP1 que tecidos normais (Eelen et al., 2008). Células tumorais que não expressam BRIP1 são extremamente sensíveis a agentes indutores de cross-link na dupla fita de DNA, como cisplatina e mitomicina C (Litman et al., 2005; Levitus et al., 2005; Levran et al., 2005). Essa condição é revertida pela complementação com BRIP1 selvagem, mas não com mutantes cataliticamente inativos (Cantor et al., 2001; Peng et al., 2007; Wu & Brosh, 2009). Juntos, estes dados sugerem que BRIP1 pode desempenhar um papel importante na resistência ao tratamento, o que é corroborado pelos altos níveis de expressão que observamos nos astrocitomas.

Recentemente, constatou-se a elevada expressão de EXO1 em câncer colorretal (Ioana et al., 2010) e carcinomas de mama (Kretschmer et al., 2011). Foi ainda constatado que este comportamento está associado a um prognóstico mais pobre (Muthuswami et al., 2013). Já foi também relatado que NEIL3 é superexpresso em tecidos tumorais de mama, colo uterino, glândula adrenal, cólon, endométrio, esôfago, rins, fígado, pulmão, linfonodo, ovários, estômago, próstata, tireóide, bexiga e útero (Hildrestrand et al., 2009). Além disso, Kauffmann et al. (2008) demonstraram que este gene é altamente expresso em melanomas e está associado ao potencial metastático desse tipo tumoral. Estes dados, juntamente com nossa observação de níveis extremamente altos de EXO1 e NEIL3 nos astrocitomas, especialmente nos GBMs (em média 85 e 97 vezes mais, respectivamente), apoia a ideia de que estes genes possam ter um papel na progressão tumoral e aquisição de resistência aos agentes genotóxicos. Possivelmente, um aumento de expressão ao longo do desenvolvimento tumoral poderia estar relacionado com a crescente instabilidade genômica que ocorre durante a progressão tumoral. Esta é uma hipótese que pretendemos investigar com análises de dados de expressão de bancos públicos.

Pouco se sabe sobre a expressão de RAD54L em tecidos tumorais. Porém, similarmente ao que observamos para os astrocitomas, Valk et al. (2012) constataram expressão aumentada de RAD54L no câncer pulmonar de células não-pequenas e propuseram

que sua superexpressão pode ser uma resposta natural às altas taxas de mutação observada em tecidos tumorais.

Estudos recentes relatam que o gene XRCC2 apresenta expressão aumentada em amostras de câncer de mama (Park et al., 2012) e de pulmão (Zheng et al., 2012). Zheng e colaboradores (2012) mostraram ainda que XRCC2 e XRCC4 são superexpressos em linhagens celulares e amostras tumorais de GBM. Além disso, foi observado que o silenciamento destes genes sensibiliza as células tumorais à radioterapia. Este dado confirma o comportamento de XRCC2 observado em nosso estudo e sugere que a expressão aumentada de genes de reparo de DNA pode estar relacionada à resistência de GBM ao tratamento.

Portanto, os resultados obtidos em nosso estudo são consistentes com a literatura, pois há evidências de superexpressão dos genes APEX1, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2 em vários tipos tumorais, bem como sua associação com a agressividade e resistência dos tumores ao tratamento. A superexpressão de genes de reparo de DNA pode ser uma resposta natural às altas taxas de mutação (Valk et al., 2012) e instabilidade genômica (Milinkovic et al., 2012) observadas durante a progressão tumoral, uma vez que o acúmulo de erros no genoma poderia levar à morte celular. Assim, genes de reparo de DNA constituem bons alvos para futuras intervenções terapêuticas, podendo melhorar a sensibilidade das células tumorais aos agentes genotóxicos, o que possibilitaria um tratamento mais eficaz.

Provavelmente, o silenciamento gênico sozinho não foi capaz de afetar a viabilidade, ciclo celular e sensibilidade à radiação ionizante de forma relevante devido à sobreposição de função das vias de reparo de DNA. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a superexpressão dos diferentes genes de reparo avaliados possa estar relacionada com a progressão tumoral dos astrocitomas e a alta resistência dos GBMs aos tratamentos, mas não apontam um potencial candidato para a sensibilização das células tumorais aos agentes genotóxicos.

6 CONCLUSÕES

Observamos que todos os genes avaliados mostraram-se significativamente mais expressos nos astrocitomas, o que pode ser uma resposta natural às altas taxas de mutação observada em tecidos tumorais uma vez que o acúmulo de erros no genoma levaria à morte celular. Além disso, vimos que o padrão de expressão de nenhum dos 7 genes avaliados se mostrou isoladamente relacionado ao prognóstico de sobrevida dos pacientes. Desse modo, concluímos que a busca de assinaturas gênicas relacionadas com a sobrevida dos pacientes com astrocitoma é a abordagem mais adequada.

Vimos ainda que o silenciamento de EXO1 ou NEIL3 não exerce influência significativa na distribuição das células no ciclo celular, nas taxas de apoptose e morte celular e na sensibilidade à radiação ionizante. Conjuntamente, nossos resultados sugerem que a superexpressão dos diferentes genes de reparo avaliados possa estar relacionada com a progressão tumoral dos astrocitomas e a alta resistência dos GBMs aos tratamentos, mas não apontam um potencial candidato para a sensibilização das células tumorais aos agentes genotóxicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, S. *et al.* hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 13629-13634, 1996.
- AGNIHOTORI, S.; BURRELL, K.E.; WOLF, A.; JALALI, S.; HAWKINS, C.; RUTKA, J.T.; ZADEH, G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther* 2013 feb;61(1):25-41.
- AL-ATTAR, A.; GOSSAGE, L.; FAREED, K. R. *et al.* Human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreaticobiliary cancers. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 704–709, 2010.
- ALBERTS, B. In: **Biologia molecular da célula**. Tradução Ana Leticia Vanz, *et al.* 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- BAI, R.Y.; STAEDTKE, V.; RIGGINS, G.J. Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 301-12, 2011.
- BAR-JOSEPH, Z.; SIEGFRIED, Z.; BRANDEIS, M.; BRORS, B.; LU, Y.; EILS, R.; DYNLACHT, B.D.; SIMON, I. Genome-wide transcriptional analysis of the human cell cycle identifies genes differentially regulated in normal and cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 955–960, 2008.
- BAUTE, J.; DEPICKER, A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43 n. 4, p. 239-276, 2008.
- BOBOLA, M. S.; BLANK, A.; BERGER, M. S.; STEVENS, B. A.; SILBER, J. R. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity Is Elevated in Human Adult Gliomas. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3510–3518, nov. 2001.
- BOBOLA, M.S.; KOLSTOE, D.D.; BLANK, A.; CHAMBERLAIN, M.C.; SILBER, J.R. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. **Frontiers in Oncology**, v.176, n. 2, 2012. DOI: 10.3389/fonc.2012.00176.
- CAM, H.; BALCIUNAITE, E.; BLAIS, A.; SPEKTOR, A.; SCARPULLA, R.C.; YOUNG, R.; KLUGER, Y.; DYNLACHT, B.D. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition, **Molecular Cell**, v. 16, p. 399–411, 2004.

CANTOR, S. B.; BELL, D. W.; GANESAN, S.; KASS, E. M.; DRAPKIN, R. et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell**, v. 105, p. 149–160, 2001.

CHANG, J. S. *et al.* Pathway analysis of single-nucleotide polymorphisms potentially associated with glioblastoma multiforme susceptibility using random forests. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 6, p. 1368-1373, jun. 2008.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, p. 3-34, 2003.

CORWIN, D.; HOLDSWORTH, C.; ROCKNE, R. C.; TRISTER, A. D.; MRUGALA, M. M.; ROCKHILL, J. K.; STEWART, R. D.; PHILLIPS, M.; SWANSON, A. R. Toward patient-specific, biologically optimized radiation therapy plans for the treatment of glioblastoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

DENYSENKO, T. et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, p. 343-51, 2010.

EELLEN, G.; BEMPT, I. V.; VERLINDEN, L.; DRIJKONINGEN, M.; SMEETS, A.; NEVEN, P.; CHRISTIAENS, M. R.; MARCHAL, K.; BOUILLON, R.; VERSTUYF, A. Expression of the BRCA1-interacting protein Brip1/BACH1/FANCD1 is driven by E2F and correlates with human breast cancer malignancy. **Oncogene**, v. 27, p. 4233 – 4241, 2008.

ESCANFELLA, F.D. Identificação de genes de reparo de DNA com expressão alterada em gliomas. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

EVANS, A. R.; LIMP-FOSTER, M.; KELLEY, M. R. Going APE over ref-1. **Mutation Research**, v. 461, p. 83–108, 2000.

FAN, C.H.; LIU, W.L.; CAO, H.; WEN, C.; CHEN, L.; JIANG, G. O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. **Cell Death and Disease**, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.388

FANG, X.; WANG, C.; BALGLEY, B.M.; ZHAO, K.; WANG, W.; HE, F.; WEIL, R.J.; LEE, C.S. Targeted Tissue Proteomic Analysis of Human Astrocytomas. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3937-46, 2012.

FARIAS-EISNER, G.; BANK, A.M.; HWANG, B.Y.; APPELBOOM, G.; PIAZZA, M.A.; BRUCE, S.S.; SANDER, C.E. Glioblastoma biomarkers from bench to bedside: advances and challenges. **British Journal of Neurosurgery**, v. 26, p. 189-194, 2012.

FRIEDBERG, E. C. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 943 – 953, 2005.

HEGI, M. E.; DISERENS, A. C.; GORLIA, T.; HAMOU, M. F.; TRIBOLET, N.; WELLER, M. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 997–1003, 2005.

HILDRESTRAND, G. A. *et al.* Expression patterns of NEIL3 during embryonic brain development and neoplasia. **Neuroscience**, v. 10, n. 45, p. 1471-2202, mai. 2009.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366–374, 2001.

HUSE, J.T.; HOLLAND, E.; DeANGELIS, L.M. Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 59-70, 2013.

IOANA, M.; ANGELESCU, C.; BURADA, F.; MIXICH, F.; RIZA, A.; DUMITRESCU, T.; ALEXANDRU, D.; TUDOREL, C.; CRUCE, M.; SAFTOIU, A. MMR gene expression pattern in sporadic colorectal cancer. **Journal of Gastrointestinal and Liver Disease**, v. 19, p. 155-159, 2010.

ISHII, N.; MAIER, D.; MERLO, A.; TADA, M.; SAWAMURA, Y.; DISERENS, A. C.; VAN-MEIR, E. G. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in Human glioma cell lines. **Brain Pathology**, v. 9, p. 469 – 479, 1999.

JAGIRDAR, K.; YIN, K.; HARRISON, M.; LIM, W.; MUSCAT, G. E. O., et al. The NR4A2 Nuclear Receptor Is Recruited to Novel Nuclear Foci in Response to UV Irradiation and Participates in Nucleotide Excision Repair. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

JIANG, Y.; ZHOU, S.; SANDUSKY, G. E.; KELLEY, M. R.; FISHEL, M. L. Reduced expression of DNA repair and redox signaling protein APE1/Ref-1 impairs human pancreatic cancer cell survival, proliferation, and cell cycle progression. **Cancer Investigation**, v. 28, p. 885–895, 2010.

KAUFFMANN, A.; ROSSELLI, F.; LAZAR, V.; WINNEPENNINCKX, V.; MANSUET-LUPO, A.; DESSEN, P.; VAN DEN OORD, J.J; SPATZ, A; SARASIN, A. High expression

of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. **Oncogene**, v. 27, p. 565-573, 2008.

KHANNA, K. K. & JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v. 27, p. 247–254, 2001.

KLOPFLEISCH, R and GRUBER, A. D. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 416-422, 2009.

KONDO, N. *et al.* DNA ligase IV is a potential molecular target in Nimustine (ACNU) sensitivity. **Cancer Science**, v. 101, n. 8, p. 1881-1885, 2010.

KOTE-JARAI, Z. *et al.* BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 8, p. 1230-1234, 2011.

KRETSCHMER, C.; STERNER-KOCK, A.; SIEDENTOPF, F.; SCHOENEGG, W.; SCHLAG, P. M. *et al.* Identification of early molecular markers for breast cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 10, p. 15-10, 2011.

KROKEIDE, S. Z. *et al.* Expression and purification of NEIL3, a human DNA glycosylase homolog. **Protein Expression and Purification**, v. 65, n. 2, p. 160-164, 2009.

KRUPA, R. *et al.* Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer - a case control study. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 4, p. 2849-2854, apr. 2011.

LEE, B.I.; WILSON, D. M. The RAD2 domain of Human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 37763-37769, 1999.

LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q.; GODTHELP, B. C.; DE VRIES, Y.; HUSSAIN, S. *et al.* The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group. **Nature Genetics**, 37: 934–935, 2005.

LEVRAN, O.; ATTWOOLL, C.; HENRY, R. T.; MILTON, K. L.; NEVELING, K. *et al.* The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v. 37, p. 931–933, 2005.

- LI, Z. *et al.* Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 226-234, apr. 2011.
- LIN, S. H.; SEVIOUR, E. G. The DNA damage response: balancing the scale between cancer and ageing. **Aging**, v. 2, n. 12, p. 900-907, dec. 2010.
- LITMAN, R.; PENG, M.; JIN, Z.; ZHANG, F.; ZHANG, J. *et al.* BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. **Cancer Cell**, v. 8, p. 255–265, 2005.
- LITOVCHICK, L.; SADASIVAM, S.; FLORENS, L.; ZHU, X.; SWANSON, S.K.; VELMURUGAN, S.; CHEN, R.; WASHBURN, M.P.; LIU, X.S.; DECAPRIO, J.A. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence, **Molecular Cell**, v. 26, p. 539–551, 2007.
- LIU, M.; BANDARU, V.; BOND, J.P.; JARUGA, P.; ZHAO, X.; CHRISTOV, P.P.; BURROWS, C.J.; RIZZO, C.J.; DIZDAROGLU, M.; WALLACE, S.S. The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 4925–30, 2010.
- LIU, M.; BANDARU, V.; HOLMES, A.; AVERILL, A.M.; CANNAN, W.; WALLACE, S.S. Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins. **Protein Expression and Purification** 2012 May. 84: 130-9.
- LIU, M.; BANDARU, V.; HOLMES, A.; AVERILL, A.M.; CANNAN, W.; WALLACE, S.S. Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 84, p.130–9, 2012.
- LIU, M.; DOUBLIE, S.; WALLACE, S.S. Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage. **Mutation Research**, v. 743, p. 4–11, 2013.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method Methods**, n. 25, v. 4, p. 402-408, 2001.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annual review of pathology: mechanisms of disease**, v. 1, p. 97-117, 2005.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 97 – 109, 2007.

LUCSFORD et al. Coordination of MYH DNA glycosylase and APE1 endonuclease activities via physical interactions. **DNA Repair**, 2013. DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.10.002.

MAHJABEEN, I.; BAIG, R. M.; SABIR, M.; KAYANI, M. A.. Genetic and expressional variations of *APEX1* are associated with increased risk of head and neck cancer. **Mutagenesis**, v. 28, p. 213 – 218, 2013.

MAJDAK, E.J.; DE BOCK, G.H.; BROZEK, I. et al. Prevalence and clinical correlations of BRCA1/BRCA2 unclassified variant carriers among unselected primary ovarian cancer cases: preliminary report. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 143–150, 2005.

MARKO, N.F. AND WEIL, R.J. The molecular biology of WHO Grade II gliomas. **Neurosurgery Focus**, 2013.

McKEAN-COWDIN, R.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.; INSKIP, P. D. et al. Associations between Polymorphisms in DNA Repair Genes and Glioblastoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, 2009.

MILINKOVIC, V.; BANKOVIC, J.; RAKIC, M.; MILOSEVIC, N.; STANKOVIC, T.; JOKOVIC, M.; MILOSEVIC, Z.; SKENDER-GAZIBARA, M.; PODOLSKI-RENIC, A.; PESIC, M.; RUZDIJIC, S.; TANIC, N. Genomic instability and p53 alterations in patients with malignant glioma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 93, p. 200 – 206, 2012.

MOL, C. D.; HOSFIELD, D. J.; TAINER, J. A. Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. **Mutation Research**, v. 460, p. 211–229, 2000.

MOORE, D. H.; MICHAEL, H.; TRITT, R.; PARSONS, S. H.; KELLEY, M. R. Alternations in the expression of the DNA repair/ redox enzyme APE/ref-1 in epithelial ovarian cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 602–609, 2000.

MOORE, S. P. G. et al. DNA modifications repaired by base excision repair are epigenetic. **DNA Repair**, 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.002>

MORLAND, I. *et al.* Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 4926–4936, 2002.

MOYNAHAN, M. E.; CUI, T. Y.; JASIN, M. Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a BRCA1 mutation. **Cancer Research**, v. 61, n. 12, p. 4842-4850, jun. 2001.

MUTHUSWAMI, M.; RAMESH, V.; BANERJEE, S.; VIVEKA, T. S.; PERIASAMY, J. *et al.* Breast Tumors with Elevated Expression of 1q Candidate Genes Confer Poor Clinical Outcome and Sensitivity to Ras/PI3K Inhibition. **PLoS ONE**, v. 8, doi:10.1371/journal.pone.0077553, 2013.

NEURAUTER, C. G.; LUNA, L.; BJORAS, M. Release from quiescence stimulates the expression of human NEIL3 under the control of the Ras dependent ERK-MAP kinase pathway. **DNA Repair**, v. 11, p. 401–409, 2012.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. The **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

PARK *et al.*, Rare Mutations in XRCC2 Increase the Risk of Breast Cancer. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 734–739, 2012.

PARKER, A.; GU, Y.; MAHONEY, W.; LEE, S.H.; SINGH, K.K.; LU, A.L. Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.5547–55, 2001.

PENG, M.; LITMAN, R.; XIE, J.; SHARMA, S.; BROSH, R. M. Jr. *et al.* The FANCI/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. **Embo J** 26: 3238–3249, 2007.

PENNINGTON, K. P.; SWISHER, E. M. Hereditary ovarian cancer: Beyond the usual suspects. **Gynecologic Oncology**, v. 124, p. 347 – 353, 2012.

PUGLISI, F.; APRILE, C.; MINISINI, A. M. *et al.* Prognostic significance of Ape/ref-1 subcellular localization in non-small cell lung carcinomas. **Anticancer Research**, v. 21, p. 4041–4049, 2001.

PUGLISI, F.; BARBONE, F.; TELL, G. *et al.* Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage I-III breast carcinoma. **Oncology**, v. 9, p. 11–17, 2002.

QIAN, B.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; ZHOU, X.; YUC, H.; CHEN, K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. **Lung Cancer**, v. 73, p. 138 – 146, 2011.

QIU, Z.K.; SHEN, D.; CHEN, Y.S.; YANG, Q.Y.; GUO, C.C.; FENG, B.H.; CHEN, Z.P. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. **Chinese Journal of Cancer**, DOI: 10.5732/cjc.012.10236, 2013.

QUIROS, S.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Rad51 and BRCA2 - New Molecular Targets for Sensitizing Glioma Cells to Alkylating Anticancer Drugs. **Homologous Recombination and Chemo-Sensitization**, v. 6, n. 11, 2011.

RAFNAR, T. *et al.* Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. **Nature Genetics**, v. 43, n. 11, p. 1104-1109, 2011.

REIS, A. and HERMANSON, O. The DNA glycosylases OGG1 and NEIL3 influence differentiation potential, proliferation, and senescence-associated signs in neural stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, p. 621–626, 2012.

ROSSI, M. J.; MAZIN, A. V. Rad51 protein stimulates the branch migration activity of Rad54 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24698-24706, 2008.

RUIZ-HERRERA, A. *et al.* Gene amplification in human cells knocked down for RAD54. **Genome Integrity**, v. 2, n. 5, 2011.

RUSSO, D.; ARTURI, F.; BULOTTA, S.; PELLIZZARI, L.; FILETTI, S.; MANZINI, G.; DAMANTE, G.; TELL, G. Ape1/Ref-1 expression and cellular localization in human thyroid carcinoma cell lines. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 24, p. 10–12, 2001.

SANTIVASI, W.L. & XIA, F. The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors. **Cell Biochemistry and Function**, v. 3, 2013.

SCHAETZLEIN, S. *et al.* Mammalian Exo1 encodes both structural and catalytic functions that play distinct roles in essential biological processes. **PNAS**, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1308512110.

SCHMUTTE, C.; MARINESCU, R.C.; SADOFF, M.M.; GUERRETTE, S.; OVERHAUSER, J.; FISHEL, R. Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. **Cancer Research**, v. 58, p. 4537-4542, 1998.

SKALLI, O.; WILHELMSSON, U.; ÖRND AHL, C.; FEKETE, B.; MALMGREN, K.; RYDENHAG, B.; PEKNY, M. Astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) displays 3 subtypes with unique expression profiles of intermediate filament proteins. **Human Pathology**, v. 44, p. 2081-88, 2013.

SZE, C.I.; SU, W.P.; CHIANG, M.F.; LU, C.Y.; CHEN, Y.A.; CHANG, N.S. Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

TAKAO, M. *et al.* Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 21, p. 3486–3493, 2002.

TAVTIGIAN, S. V. *et al.* The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nature Genetics**, v. 12, n. 3, p. 333-337, 1996.

TAYRAC, M.; AUBRY, M.; SAİKALI, M. *et al.* A 4-Gene Signature Associated with Clinical Outcome in High-Grade Gliomas. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 317 – 327, 2011.

TELL, G.; DAMANTE, G.; CALDWELL, D.; KELLEY, M. R. The intracellular localization of APE-1/Ref-1: more than a passive phenomenon? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 367–384, 2005.

TELL, G.; PELLIZZARI, L.; PUCILLO, C.; PUGLISI, F.; CESSSELLI, D.; KELLEY, M. R.; LORETO, C. D.; DAMANTE, G. TSH controls Ref-1 nuclear localization in thyroid cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 24, p. 383–390, 2000.

TIMOFEYEVA, N. A. *et al.* Lys98 Substitution in Human AP Endonuclease 1 Affects the Kinetic Mechanism of Enzyme Action in Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

TORISU, K.; TSUCHIMOTO, D.; OHNISHI, Y.; NAKABEPPU, Y. Hematopoietic tissuespecific expression of mouse Neil3 for endonuclease VIII-like protein. **Journal of Biochemistry**, v. 138, p. 763–772, 2005.

TORNALETTI, S. & HANAWALT, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. **Biochimie**, v. 81, p. 139–148, 1999.

TSARYK, R.; FABIAN, K.; THACKER, J.; KAINA, B. Xrcc2 deficiency sensitizes cells to apoptosis by MNNG and the alkylating anticancer drugs temozolomide, fotemustine and mafosfamide. **Cancer Letters**, v. 239, n. 2, p. 305–313, 2005.

VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S.; TORRIERI, R. et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) Levels Is Correlated with Glioblastoma Cells Survival. **PLoS ONE**, v. 8, doi:10.1371/journal.pone.0062200, 2013.

VALENTE, V.; TEIXEIRA, S.; NEDER, L.; OKAMOTO, O. K.; OBA-SHINJO, S. M.; MARIE, S. K. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, 2009.

VALK, K.; VOODER, T.; KOLDE, R.; REINTAM, M.A.; PETZOLD, C.; VILO, J.; METSPALU, A. Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: Survival Prediction and New Biomarkers. **Clinical Translational Research**, v. 79, p. 283-292, 2011.

VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA doublestranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 196–206, 2001.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. Brain tumor stem cells. **National Reviews of Cancer**, v. 6, p. 425-36, 2006. DOI: 10.1038/nrc1889

WALLACE, S.S. DNA Glycosylases Search for and RemoveOxidized DNA Bases. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, p. 691-704, 2013.

WANG, H. and HAYS, J.B. Construction of MMR plasmid substrates and analysis of MMR error correction and excision. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 345–53, 2006.

WANG, Y.; SHUPENKO, C.C.; MELO, L.F.; STRAUSS, P.R. DNA repair protein involved in heart and blood development, **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, p. 9083–9093, 2006.

WHITFIELD, M.L.; SHERLOCK, G.; SALDANHA, A.J.; MURRAY, J.I.; BALL, C.A.; ALEXANDER, K.E.; MATESE, J.C.; PEROU, C.M.; HURT, M.M.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors, **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 1977–2000, 2002.

WIENCKE, J.K.; ALDAPE, K.; McMILLAN, A.; WIEMELS, J.; MOGHADASSI, M.; MIIKE, R.; KELSEY, K.T.; PATOKA, J.; LONG, J.; WRENSCH, M. Molecular features of adult glioma associated with patient race/ethnicity, age and a polymorphism in O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 1774-1783, 2005.

WOOD, R.D.; MITCHELL, M.; SGOUROS, J.; LINDAHL, T. Human DNA repair genes. **Science**, v. 291, p. 1284–1289, 2001.

WOOSTER, R. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789-792, 1995.

WU, H. H.; CHENG, Y. W.; CHANG, J. T.; WU, T. C.; LIU, W. S.; CHEN, C.Y.; LEE, H. Subcellular localization of apurinic endonuclease 1 promotes lung tumor aggressiveness via NF-kappaB activation. **Oncogene**, v. 29, 4330–4340, 2010.

WU, Y.; BROSH, R. M. Jr. FANCI helicase operates in the Fanconi Anemia DNA repair pathway and the response to replicational stress. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p. 470–482, 2009.

XANTHOUDAKIS, S.; SMEYNE, J. D.; WALLACE, J. D.; CURRAN, T. The redox/DNA repairprotein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.8919–8923, 1996.

YANG, J.; YANG, D.; COGDELL, D. *et al.* APEX1 gene amplification and its protein overexpression in osteosarcoma: correlation with recurrence, metastasis, and survival. **Technology Cancer Research Treatment**, v. 9, p. 161–169, 2010.

YOSHIMOTO, K.; MIZOGUCHI, M.; HATA, N.; MURATA, H.; HATAE, R.; AMANO, T.; NAKAMIZO, A.; SASAKI, T. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, v. 2, 2012.

ZHENG, Z.; LOON, N.G.W.; ZHANG, X.; OLSON, J. J.; HAO, C.; CURRAN, W. J.; WANG, Y. RNAi-mediated targeting of noncoding and coding sequences in DNA repair gene messages efficiently radiosensitizes human tumor cells. **Cancer Research**, v. 72, p. 1221-1228, 2012.

ZHOU, B. B. & ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433–439, 2000.

ZHOU, H.; XU, M.; HUANG, Q.; GATES, A.T.; ZHANG, X.D.; CASTLE, J.C.; STEC, E.; FERRER, M.; STRULOVICI, B.; HAZUDA, D.J.; ESPESETH, A.S. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. **Cell Host Microbe**, v. 4, p. 495–504, 2008.

ZHOU, Y. AND PAULL, T. T. DNA-dependent Protein Kinase regulates DNA end resection in concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM). **The Journal of Biological Chemistry**, 2013.