

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

**Efeitos citotóxicos e toxicogenômicos dos antineoplásicos
cisplatina e gencitabina em células de carcinoma de bexiga**

Glenda Nicioli da Silva

Daisy Maria Fávero Salvadori

Orientadora

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP, para
obtenção do título de Doutor em Patologia

Botucatu – SP

2009

“Até que se esteja comprometido, sobrevém a hesitação, a possibilidade de recuar, uma ineficiência permanente. Todo ato de iniciativa (e criação) responde a uma única verdade elementar, e desconhecê-la mata incontáveis idéias e esplêndidos planos: a partir do momento em que o indivíduo se compromete definitivamente, a Providência se move junto com ele. Toda uma cadeia de eventos emana da decisão do indivíduo, levando a seu favor todos os tipos de imprevistos, encontros e assistência material que ninguém jamais sonharia que pudessem ocorrer desta maneira.” (W. H. Murray)

Dedicatória

À Deus

“Posso, tudo posso, n’Aquele que me fortalece e nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.” (Celina Borges)

À minha família:

Meu pai José Moreira da Silva e minha mãe Isabel Cristina Nicioli Silva, pelo amor incondicional, carinho, incentivo, orações e apoio que me possibilitaram grandes conquistas. Meus irmãos Glauco Nicioli da Silva e Glauber Nicioli da Silva e minhas cunhadas Andréa Alves Andalécio e Natália Moreira Alcântara da Silva, por estarem sempre presentes dividindo todos os momentos. Todos vocês são especiais.

Agradecimentos especiais

À Dra Daisy Maria Fávero Salvadori,

Pela orientação e por ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa que possibilitou meu crescimento profissional. Obrigada pela confiança depositada, pelo incentivo, conselhos, ensinamentos, amizade, exemplo de seriedade, profissionalismo, compreensão e paciência.

Ao Dr Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior e à Dra Elza Tieme Sakamoto-Hojo,

Pela possibilidade de realizar parte dos meus experimentos no Laboratório de vocês. Saibam que aprendi muito com essas experiências. Obrigada pelas sugestões, pela prazerosa convivência e pelos diversos ensinamentos.

“Se fui mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes.” Isaac Newton

Agradecimentos

À Dra Catarina Satie Takahashi, pelo carinho e ótima convivência durante a realização dos meus experimentos em Ribeirão Preto.

À Dra Jennifer Southgate, diretora do *Jack Birch Unit, Department of Biology, University of York*, por ter permitido a realização do estágio em seu laboratório.

Ao Dr José Eduardo Corrente, pelas análises estatísticas.

Ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, por permitir a realização dos experimentos de citometria de fluxo e à Dra. Márjorie de Assis Golim, pela ajuda nos procedimentos e pela amizade.

À Cristina Aparecida Alquati Dorico, por sempre estar disposta a ajudar, solucionando os problemas com muita eficiência e rapidez.

Aos colegas do **Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica**: Rodrigo Otávio Alves de Lima, Priscilla Davdison Negraes, Danielle Cristina de Almeida, Renato Paschoal Prado, Grazielle E. Lopes Fontes, Luciana Maria Feliciano, Fábio Pires Machado, Felipe Moraes Barros Ebúrneo, Rafael Dias de Moraes, Davi Barcellos de Oliveira e Juliana Giacobino. Obrigada por proporcionarem momentos tão agradáveis. Em especial, ao João Paulo de Castro Marcondes, que foi um verdadeiro amigo e companheiro fiel, dentro e fora do laboratório, dividindo as alegrias e dificuldades, muitas vezes deixando de fazer as suas coisas para ajudar nas minhas. À amiga Mariana Gobbo Braz, pelas nossas inúmeras conversas, passeios, discussões de trabalho e por todo aquele incentivo e conselhos antes da viagem. À Elaine Aparecida de Camargo e à Eliana Maria Minicucci, pela amizade.

Aos colegas do Departamento de Genéticas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: **Laboratório de Citogenética e Mutagênese** (Igor Magela Merchi, Paulo Roberto D. V. de Godoy, Giovana Silva Leandro, Ana Paula de Lima Montaldi, Patrícia O. Carminati, Danilo Jordão Xavier, Douglas V. N. Perez de Oliveira, Stephano Spanó Mello, Carmen Lúcia Bassi., Maria Sol Brassesco Annichini, Danillo Lucas Espósito, Raquel Alves dos Santos, Ana Claudia Teixeira, Vinicius Pereira de Carvalho, Cristiano José da Silva, Aline Poersch, Sueli Aparecida Neves e Luis Augusto da Costa Júnior) e **Grupo de Imunogenética Molecular** (Danielle Aparecida Rosa de Magalhães, Guilherme Liberato da Silva, Cláudia

Macedo, Cristina Moraes Junta, Márcia Maria Chiquitelli Marques, Thaís Arouca Fornari, Paula Barbim Donate, Vanesa Fontana, Adriane Feijó Evangelista e Janaína de Andréa Dernowsek). Obrigada por terem me recebido tão bem, pela imensa ajuda nos experimentos, pelas prazerosas conversas e pelos inúmeros momentos de descontração.

À Janete Aparecida Herculano, Regina Célia Spadin, Nathanael Pinheiro Salles e Tânia Alice de Andrade, da Seção de Pós-Graduação, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Rosemary Cristina da Silva; obrigada pela força, pelo incentivo, pela compreensão, pelos conselhos, pela paciência e por dividirmos tantos momentos. Não poderia me esquecer também da imensa ajuda nas correções bibliográficas. Você é uma amiga muito especial. À Luciana Pizzani, pela amizade e por muitos momentos divertidos e práticos.

A todos os meus verdadeiros amigos do GOU Adorai. Depois de vocês aprendi o verdadeiro sentido da amizade e passamos a compartilhar o mesmo sonho. Vocês têm participação especial na minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Apoio Financeiro.

SUMÁRIO

1 – RESUMO	7
2 - REVISÃO DA LITERATURA	9
3 – OBJETIVOS	16
4 – MANUSCRITO 1: Apoptosis and cell cycle arrest in bladder carcinoma cell lines with different TP53 status treated with cisplatin and gemcitabine.....	17
5– MANUSCRITO 2: Perfil de expressão gênica em linhagens celulares de câncer de bexiga submetidas ao tratamento com agentes quimioterápicos	38
6 – CONCLUSÕES	74
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 - RESUMO

Os agentes químicos utilizados para o tratamento do câncer ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, ativação ou desativação de mecanismos de reparo do DNA e apoptose. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por tais atividades ainda não foram completamente elucidados. Nesse contexto, os estudos de expressão gênica tornaram-se ferramentas importantes para a obtenção de informações que podem contribuir para o entendimento das respostas celulares frente à exposição a agentes neoplásicos e os mecanismos envolvidos na gênese e regressão de neoplasias. Em relação ao câncer de bexiga, a combinação de cisplatina/gencitabina é considerada como protocolo quimioterapêutico padrão. Entretanto, o mecanismo exato de ação dessas drogas ainda não foi completamente elucidado, principalmente no que diz respeito ao *status* do gene *TP53*, uma das principais alterações encontradas em câncer de bexiga. Com base nessas premissas, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da cisplatina e da gencitabina sobre o índice apoptótico, ciclo celular e padrão de expressão gênica, em 3 linhagens de células de carcinoma transicional de bexiga (RT4, *TP53* selvagem, grau 1; 5637, *TP53* mutado, grau 2; T24, *TP53* mutado, grau 3). Para avaliar tais respostas celulares foram utilizados os ensaios de citotoxicidade, sobrevivência celular e clonogenicidade, análise do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo, e análise da expressão gênica usando microarranjos de cDNA. Os resultados mostraram: 1) que as células *TP53* selvagem (RT4) foram mais sensíveis à apoptose do que células *TP53* mutadas quando tratadas com cisplatina e gencitabina, ou com a combinação de ambas; 2) parada permanente do ciclo em G1, nas três linhagens celulares, após tratamento com a gencitabina e com a combinação cisplatina/gencitabina; 3) baixas porcentagens de sobrevivência celular, independentemente do *status* de *TP53*, após tratamento com a combinação de drogas; 4) que os agrupamentos hierárquicos de expressão gênica para cada linhagem celular (grupos de genes diferencialmente expressos em relação ao controle) incluíram aqueles relacionados, principalmente, à apoptose, ao reparo de danos no DNA e a constituintes celulares; 5) que o padrão de expressão da linhagem de grau 1 (RT4) se mostrou mais semelhante ao da linhagem de grau 3 (T24); 6) que nas três linhagens celulares, o tratamento combinado cisplatina/gencitabina foi o que causou maior alteração no padrão de expressão gênica. Concluindo, além da combinação cisplatina/gencitabina ter apresentado efeito antiproliferativo em todas as células, esse tratamento parece ter sido o mais efetivo, independentemente do grau do tumor, apesar de alguns genes relacionados, por exemplo, a oncogênese e à progressão tumoral terem sido inversamente modulados pelo tratamento.

Dessa forma, o sinergismo entre baixas concentrações de cispaltina e gencitabina poderia ter relevância clínica, já que o uso de altas concentrações de cisplatina tem se revelado tóxico para o organismo.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de bexiga ocupa a quarta posição entre as neoplasias mais comuns no mundo Ocidental (Kirkali et al., 2005). No Brasil, na década passada, os cânceres de bexiga ocupavam a 7^a e a 10^a posição entre os tipos mais frequentes em homens e mulheres, respectivamente (Brasil, 1999). Independentemente da etnia, os homens têm de 2,5 a 5 vezes mais riscos de desenvolver esse tipo de câncer do que as mulheres, sendo que 2/3 dos casos ocorrem em pessoas com idade superior a 65 anos (Yu et al., 2002). O primeiro fator de risco descrito para o câncer de bexiga foi a exposição ocupacional de trabalhadores de indústria têxtil e fábricas de pneus a arilaminas (Yu et al., 1994). Mais recentemente, a tintura de cabelo, outra fonte de arilaminas, foi também associada ao câncer de bexiga (Gago-Dominguez et al., 2001). Atualmente, o cigarro é considerado como o mais importante fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia, devido aos grandes níveis de arilaminas presentes no tabaco (Yu et al., 2002).

Estruturalmente, a bexiga de mamíferos caracteriza-se por ser um órgão oco, com a parede compreendendo as camadas serosa, muscular, submucosa, mucosa muscular e lâmina própria, com uma camada de células epiteliais transitórias de origem endodermal cobrindo a superfície interna (Lewis, 2000). Os carcinomas de células transitórias (CCT) de bexiga compreendem cerca de 90% dos cânceres neste órgão, com os 10% restantes sendo representados por carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequenas e, raramente, tumores derivados do mesênquima. Patologicamente, o CCT de bexiga é classificado pela extensão do tumor primário (estadiamento) e pelo grau de diferenciação histológica, podendo apresentar-se como tumor papilar, carcinoma *in situ* (CIS), tumor músculo-invasivo e doença avançada, envolvendo nódulos extra-pélvico e doença metastática (Chester et al., 2004). Histologicamente, a maioria dos tumores invasivos não tem precursor papilar, são lesões invasivas sólidas e são normalmente associados ao carcinoma *in situ*. O mecanismo proposto de progressão dessas lesões é baseado na atipia urotelial, displasia, CIS e CCT invasivo. Contudo, mecanismo distinto é observado para o CCT papilar de baixo grau, que tem como origem a hiperplasia urotelial, progredindo para atipia e posterior desenvolvimento da neoplasia (Knowles et al., 2001).

A recorrência tumoral, ou mais precisamente a ocorrência de um novo tumor, é um fenômeno frequentemente observado em CCT de bexiga. Aproximadamente 70% dos pacientes com tumores superficiais têm recorrências, e somente cerca de 10% a 20% progredem para invasão muscular (Smith, 1999). Muitos estudos têm mostrado que numerosas

alterações genéticas e moleculares estão presentes no CCT de bexiga, muito embora os mecanismos que levam ao fenótipo maligno não sejam, ainda, completamente entendidos (Catto et al., 2004). Sabe-se, no entanto, que o acúmulo de alterações genéticas, e não apenas uma única mutação, é o que vai determinar o comportamento clínico do CCT (Kim & Kim, 2006). Análises genéticas têm mostrado que os oncogenes *RAS* (correlação com recorrência) e *erb-B2* (correlação com sobrevida), o gene supressor tumoral *TP53* (correlação com sobrevida, progressão e recorrência) e o fator de crescimento *EGF/EGFR* (correlação com recorrência e progressão) são os mais importantes marcadores prognósticos para o câncer de bexiga (Kausch & Bohle, 2002). Mutações no gene *H-RAS* têm sido correlacionadas ao prognóstico do CCT, sendo que cerca de 20% dos tumores mostram alterações nos códons 12 e 61 (Nagata et al., 1990). Alguns autores encontraram que 39% dos tumores de bexiga possuem deleções no cromossomo 11, com 63% apresentando, também, deleções no cromossomo 17p (Tsai et al., 1990). Somado a isso, a perda de 9q foi observada principalmente em CCT papilar de baixo grau, enquanto alterações no gene *TP53* caracterizam o CCT de alto grau (Baithun et al., 2001). Em contraste, Friederich et al. (2001) demonstraram que a detecção imunistoquímica da proteína p53, ao invés de detecções de alterações genéticas no gene *TP53*, é a forma mais acurada de prognóstico para pacientes com CCT superficial.

No que se refere à expressão gênica, o protooncogene *c-myc*, cujo produto está relacionado ao grau tumoral, tem se mostrado hiperexpresso nos cânceres de bexiga (Kausch & Bohle, 2002). Genes relacionados à transdução de sinais, ao ciclo celular, à metástase e à inibição da apoptose também aparecem hiperexpressos, em contraste aos genes relacionados à apoptose, às moléculas de adesão e aos genes supressores tumorais que se mostram hipoexpressos (Hao et al., 2002). A hiperexpressão de genes como *LAMB3* e *ITGB4*, que codificam proteínas envolvidas na adesão celular, foi associada ao CCT sem CIS adjacente (Wilson et al., 1996). Alguns pesquisadores relataram, por exemplo, a expressão aumentada de claudina 7 (gene envolvido na formação de *tight junctions* em células epiteliais) em CCT superficial, quando comparados ao CCT invasivo (Elsamman et al., 2006). Dyrskjot et al. (2004) demonstraram que o padrão de expressão gênica observado em biópsias de CIS é semelhante a aqueles detectados em CCT superficial, carcinoma invasivo muscular e urotélio histologicamente normal de bexiga com CIS. Outro estudo demonstrou que, em termos de expressão gênica, os tumores podem ser diferenciados em carcinoma *in situ* ou lesões

papilares superficiais, além de poderem ser classificados em subgrupos dentro de doença invasiva e não invasiva (Sanches-Carbayo et al., 2003).

No que diz respeito à expressão protéica, a expressão de E-caderinas e moesina (relacionadas à adesão celular) e alterações na proteína p53 (parada do crescimento celular ou processos apoptóticos em resposta ao *stress* celular) e/ou pRB (regula saída de G1) nos tumores de bexiga primários analisados foram significativamente associados ao estágio e grau tumoral (Sanches-Carbayo et al., 2002). Recentemente, alguns autores descreveram a complexidade da rede das galectinas em câncer urotelial, sugerindo que essas proteínas poderiam ser alvos potenciais para a terapia (Langbein et al., 2007). As galectina-1 e 3 (moduladoras de crescimento, adesão e invasão tecidual) foram detectadas, principalmente, nos tumores de alto grau, com papel importante na progressão da doença (Sheng et al., 2006). No entanto, a expressão da proteína NF1, conhecida por atuar como supressora tumoral, não foi detectada em linhagens celulares de CCT de grau 3, sendo detectadas, apenas, em linhagens de grau 1 e 2 (Aaltonen et al., 1999).

Por outro lado, publicações recentes têm também demonstrado a importância de eventos epigenéticos no desenvolvimento do câncer urotelial. A herança epigenética é definida como a informação celular herdada durante a divisão, mas que não está contida na seqüência de DNA, apresentando-se, pois, de três maneiras: metilação do DNA, *imprinting* genômico e modificação das histonas (Egger et al. 2004; Glasspool et al. 2006). Considerando o importante efeito regulador da expressão gênica, a metilação é especialmente relevante quando envolve áreas ricas em dinucleotídeos CpG, conhecidas como ilhas CpG. Regiões promotoras de genes ativamente transcritos, frequentemente ricas nessas seqüências de dinucleotídeos, são quase invariavelmente não metiladas (Turker & Bestor, 1997). Marsit et al. (2006) estudando diversos tipos de tumores sólidos, concluíram que, apesar dos perfis de hipermetilação da região promotora do gene serem distintos entre as doenças, sozinhos não seriam suficientes para a classificação dos tumores. Os autores sugerem, também, que a hipermetilação da região promotora de genes específicos não ocorre independentemente ou casualmente, mas, no mínimo, é produto de um processo seletivo complexo e específico, em parte, por exposição a carcinógenos, susceptibilidade inata e processos tecido-específicos.

Os procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida (Reznikoff et al., 2000) e fazem com que os pacientes sejam considerados grupo de risco para o desenvolvimento neoplásico de novo (Qureshi et

al., 2000) e susceptíveis a recorrências (Hisataki et al., 2001). Há dados na literatura mostrando, por exemplo, o aumento da frequência de lesões uroteliais (hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*) em pacientes que, acompanhados pelo período de um ano após a cirurgia, apresentavam urotélio macroscopicamente normal (Harris, 1992). Outra forma de tratamento para os CCTs é a quimioterapia, que inclui, preferencialmente, os compostos cisplatina e gencitabina. Os sinais primários da ação de tais medicamentos são as alterações no DNA que levam a eventos moleculares que podem resultar em bloqueio na progressão do ciclo celular e apoptose, os quais são respostas essenciais à manutenção da integridade genética da célula normal. Em células neoplásicas, a resposta ao agente terapêutico, que pode ocorrer de diversas maneiras, é que define o sucesso ou não do tratamento (Amudson et al., 1999). É de se supor, portanto, que o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas respostas das células neoplásicas frente aos agentes quimioterápicos pode contribuir para a maior eficácia da terapia contra o câncer.

Devido ao longo período necessário para o acompanhamento e tratamento dos tumores, o custo por paciente com câncer de bexiga é o mais alto quando comparado a outros tipos de cânceres (Botteman et al., 2003). Desta maneira, medicamentos mais promissores surgem para substituir o mais comum regime de multidrogas MVAC (metrotrexate, vinblastine, doxurubicina e cisplatina). Alguns estudos têm mostrado que a quimioterapia com drogas combinadas é considerada a mais adequada para a neoplasia de bexiga. A cisplatina, por exemplo, quando combinada a outras drogas tem se mostrado mais eficaz do que quando administrada isoladamente. Entre os novos protocolos foi observado que a cisplatina apresenta importante interação sinérgica com a gencitabina mostrando maior eficácia e menor toxicidade (Chester et al., 2004).

Atualmente, vários estudos têm focado no mecanismo de ação dos agentes antineoplásicos. A gencitabina (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC), agente quimioterápico utilizado para o CCT, é um análogo estrutural da deoxycitidina (dCTP). Esta droga é fosforilada intracelularmente pelas quinases-nucleosídeo aos nucleosídeos ativos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP). A ação citotóxica da gencitabina parece estar relacionada à inibição da síntese do DNA pela dupla ação do dFdCDP e do dFdCTP, que têm como alvos o DNA e o RNA. O dFdCTP inibe a DNA polimerase e o dFdCDP inibe a ribonucleotídeo redutase, que é a única responsável pela catalisação das reações que geram os deoxinucleosídeos trifosfatos para a síntese do DNA. Inicialmente, a inibição desta enzima leva à redução nas concentrações de deoxinucleosídeos em geral, posteriormente, o dFdCTP

compete com o dCTP para incorporação no DNA, com conseqüente inibição da síntese e possível entrada da célula em apoptose (Peters et al., 1996). Crul et al. (2003) sugerem que o reparo por excisão de base (BER - *base excision repair*), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*), o reparo por recombinação homóloga (HRR - *homologous recombination repair*) e o reparo por união de extremidades não homólogas (NHEJ - *non-homologous end joinin*) do DNA são mecanismos improváveis de modulação da citotoxicidade induzida pela gencitabina. No entanto, o HRR parece estar envolvido na interação sinérgica entre essa droga e a cisplatina em células de ovário de hamster chinês (CHO). Tem sido também relatado que a hiperexpressão de ribonucleotídeo redutase pode ser um mecanismo de resistência à gencitabina (Goan et al., 1999). Paulwels et al. (2003) demonstraram que a gencitabina induz bloqueio na fase S do ciclo celular. Essa droga poderia atuar direta ou indiretamente inibindo a síntese do DNA por meio de diferentes mecanismos: inibição de enzimas celulares, especialmente a ribonucleotídeo redutase, levando à diminuição dos nucleotídeos celulares disponíveis (Huang et al., 1991), e aumento dos níveis de ligase I (Sun et al., 2002).

A cisplatina, por sua vez, é um agente quimioterápico que atua ligando-se covalentemente ao N7 de bases púricas formando ligações cruzadas em uma mesma fita ou, em menor freqüência, entre as duas fitas da cadeia do DNA (Eastman, 1983). Tais aductos podem levar à formação de falhas e quebras de dupla fita e promover uma variedade de respostas celulares, incluindo, por exemplo, a inibição da síntese de DNA (Mello et al., 1998). Anteriormente, acreditava-se que o NER era o mecanismo mais importante na defesa celular contra as lesões induzidas pela cisplatina. Hoje, acredita-se que os mecanismos de recombinação são também importantes para o reparo dos danos no DNA induzidos por esta droga (Zdraveski et al., 2000). Por outro lado, a perda da atividade de reparo de erros de pareamento de bases (MMR - *mismatch repair*) foi demonstrada como um mecanismo de resistência à cisplatina (Fink et al., 1997). Mais recentemente, foi demonstrado que os mecanismos de NER, de HRR e de TLS (*translesion synthesis*), separadamente, são importantes para a sobrevivência de células eucarióticas expostas à cisplatina (Beljanski et al., 2004). Alguns estudos demonstraram, ainda, que a hiperexpressão de genes como o *HMG1* (envolvido no mecanismo de MMR) (Nagatani et al., 2001), o *ERCC1* (envolvido no mecanismo de NER) (Rossell et al., 2002), o *BRCA-1* (Husain et al., 1998) e o *GST- π* (Ban et al., 1996) pode estar envolvida no mecanismo de resistência a cisplatina, muito embora os genes *XPD*, *XPB*, *XPA*, *XPC*, *XPF* e *XPG*, também envolvidos no mecanismo de NER,

parecem não ter papel fundamental na sensibilidade ou resistência a essa droga (Damia et al., 1998).

Os estudos *in vitro* são ferramentas fundamentais não apenas para o entendimento da gênese e desenvolvimento de diversas doenças, mas, também, para a avaliação de protocolos de tratamento. Além de permitir a identificação de efeitos primários, as culturas de células possibilitam avaliar os efeitos toxicogênicos induzidos por diferentes doses e combinações de drogas. Nesta linha de raciocínio, novas pesquisas vêm sendo direcionadas para a definição de conjuntos gênicos que possam ser utilizados como marcadores nas avaliações prospectivas da resposta tumoral aos agentes quimioterápicos (Longley et al., 2003). Cabe lembrar que uma das questões mais críticas a ser ainda elucidada com respeito à quimioterapia é a necessidade de se estabelecer métodos para prever a eficácia ou toxicidade das drogas antineoplásicas em diferentes situações (Zembutsu et al., 2002).

A Toxicogenômica é hoje um campo de estudo que combina dados clínicos, da genômica e da proteômica para o entendimento da base genética e bioquímica de diversas doenças (Olden et al., 2001; Simmons & Portier, 2002; Hamadeh et al., 2002). Recentemente, Tennant (2002) descreveu a Toxicogenômica como um campo da ciência que estuda a relação entre o genoma e a resposta biológica do organismo frente à exposição a agentes tóxicos e estressores. Nesse contexto, o advento da tecnologia do cDNA *microarray* tem enorme implicação para a terapêutica do câncer, uma vez que facilita a análise da expressão de um amplo espectro de genes. Mudanças no padrão de expressão gênica podem se constituir, por exemplo, em marcadores mais sensíveis e imediatos da toxicidade de drogas do que aqueles detectados em testes tipicamente toxicológicos (alterações morfológicas, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva) (Lee et al., 2005). Desta forma, a Toxicogenômica se concretiza como disciplina fundamental tanto para o estudo da gênese como para o estabelecimento de terapias mais eficazes para o câncer, já que permite definir eventos moleculares que precedem e acompanham a toxicidade dos antineoplásicos, esclarecendo mecanismos que ainda são pouco entendidos (Orphanides, 2003). Além disso, a Toxicogenômica vislumbra avanços significativos na pesquisa toxicológica, combinando ferramentas da toxicologia tradicional com a genômica e a bioinformática (Hayes & Bradfield, 2005).

Cabe ressaltar, entretanto, que a maioria das investigações utilizando a metodologia do *cDNA microarray* focou a classificação dos subtipos tumorais e prognóstico para o paciente, ao invés da resposta frente ao tratamento com drogas antitumorais (Sorlie et al., 2001; van de

Vijver et al., 2002; van't Veer et al., 2002). Alguns autores, contudo, tem enfatizado a importância de se entender este mecanismo de ação de tais medicamentos. Kortmanky et al. (2005) demonstraram que a inibição do gene *CHEK1* favorece o acúmulo de quebras de DNA, aumentando a sensibilidade das células tumorais aos agentes antineoplásicos. Da mesma maneira, Tenzer et al. (2003) mostraram que a inibição de *CHEK1* pode potencializar o efeito de agentes que causam danos no DNA de células de câncer deficientes no gene *TP53*. Os genes *RUVBL2* e *DCRLREIC* também mostraram ser de grande relevância, pois se apresentaram alterados frente ao tratamento com radiação ionizante. Sabe-se que mudanças na expressão de *RUVBL2* resultam em alterações no ciclo celular (diminuição do tempo da parada em G2), redução da resposta apoptótica e indução do reparo no DNA (Cho et al., 2001). Da mesma forma, deficiências na expressão de *DCRLREIC* levam a defeitos no *checkpoint* G2/M do ciclo celular (Darroudi et al., 2007). Por outro lado, os genes da família da glutationa S-transferase, como o *GSTM3*, protegem as células contra insultos tóxicos por catalizar adições nucleofílicas, ou reações de substituição entre glutationa e compostos eletrofílicos reativos (Liu et al., 2005). Importante também é o gene *CLSPN*, que expressa proteínas reguladoras do ciclo celular, as quais se associam à cromatina durante a fase S (Lee et al., 2003). No caso de danos no DNA, essas proteínas são fosforiladas e interagem com a proteína Chk1. Essa interação é necessária para ativação do mecanismo Chk1 dependente de ATR (Kumagai et al., 2004). Há estudo mostrando, por exemplo, que a ausência de expressão do gene *CLSPN* em células na fase G1 previne a entrada precoce na fase S (Chen & Sanchez, 2004).

3 – OBJETIVOS

A resistência a drogas antineoplásicas, o efeito tóxico ao paciente e a recorrência tumoral em curto prazo permanecem, ainda, entre os maiores obstáculos na quimioterapia do câncer de bexiga. Desta maneira, torna-se relevante investigar o mecanismo de ação de drogas antineoplásicas, a fim de identificar marcadores que permitam determinar a eficácia, ou não, dos protocolos de tratamento. Portanto, os objetivos do presente estudo foram:

- investigar os efeitos da cisplatina e da gencitabina em linhagens celulares de CCT de bexiga (RT4, de tumor grau 1, *TP53* selvagem; 5637, de grau 2 e *TP53* mutado; T24, de grau 3 e *TP53* mutado) sobre o índice apoptótico, distribuição do ciclo celular, citotoxicidade e sobrevivência celular e clonogênica.
- analisar os perfis de expressão gênica em larga escala nas três linhagens celulares de CCT de bexiga após tratamentos com os antitumorais cisplatina e gencitabina.

APOPTOSIS AND CELL CYCLE ARREST IN BLADDER CARCINOMA CELL LINES WITH DIFFERENT *TP53* STATUS TREATED WITH CISPLATIN AND GEMCITABINE

Glenda Nicioli da Silva¹; João Paulo de Castro Marcondes¹; Elaine Aparecida de Camargo¹, Geraldo Aleixo Passos^{2,3}, Elza Tieme Sakamoto-Hojo^{4,5}, Daisy Maria Fávero Salvadori¹.

¹ Laboratory of Toxicogenomics & Nutrigenomics, Dept. Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – São Paulo State University – Brazil; ²Discipline of Genetics, Department of Morphology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁴Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁵Department of Biology (FFCLRP), USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: Glenda Nicioli da Silva, Botucatu Medical School – UNESP, Rubião Junior, 18618-917, Botucatu, SP, Brazil (e-mail:nicioli@fmb.unesp.br). Phone: +55-14 38117263.

Key words: apoptosis; cisplatin; gemcitabine; *TP53*; urinary bladder transitional cell carcinoma

Trabalho a ser enviado para a revista *The Journal of Urology*

ABSTRACT

Background: currently, the combination cisplatin/gemcitabine is considered a (second) standard chemotherapeutical protocol for bladder cancer. However, the mechanism by which these drugs act on tumor cells is not completely understood. Therefore, the aim of the present was to investigate the effects of these two antineoplastic drugs on the apoptotic index and cell cycle distribution in urinary bladder transitional cell carcinoma (TCC) cell lines with different *TP53* status (RT4, with wild type *TP53*; 5637 and T24, with mutated *TP53*). **Methods:** cytotoxicity, cell survival and clonogenic survival assays, and flow cytometry analysis for cell cycle and apoptosis cells were done in the cell lines treated with different concentrations of cisplatin and gemcitabine. **Results:** wild type *TP53* cells were more sensitive to apoptosis than mutated *TP53* cells when treated with cisplatin or gemcitabine; permanent G1 cell-cycle arrest was observed in the three cell lines after treatment with gemcitabine or with the combination of both; significant cell death was detected in all the cell lines after treatments with cisplatin or gemcitabine. However, when drugs were given in combinations, lower percentage of survival occurred independent on *TP53* status. **Conclusions:** it was demonstrated that the combination of cisplatin and gemcitabine can be effective despite of tumor-associated *TP53* mutations. Thus, the synergism between low concentrations of cisplatin and gemcitabine may have clinical relevance, since the use of high concentrations of cisplatin is toxic to the whole organism.

INTRODUCTION

Urinary bladder cancer is the fourth most common malignancy in the Western world (Kirkali et al., 2005), with transitional cell carcinoma (TCC) comprising about 90% of all primary bladder tumors (Chester et al., 2004). Though the majority of patients present with superficial bladder tumors, nearly 10% to 30% develop invasive disease (Millan-Rodriguez et al., 2000). The most important risk factor for bladder cancer seems to be cigarette smoking (Zeegers et al., 2000). Other risk factors include certain occupational exposures (arylamines) or dietary components (Olfert et al., 2006).

Combined chemotherapeutic protocols have been extensively studied in the hope of treating the urinary bladder cancer or improving overall survival (Gallagher et al., 2008). Recent treatments include the drugs methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin (MVAC). However, since cisplatin has been demonstrated to have a synergistic interaction with gemcitabine (von der Maase et al., 2005), this combination is now widely considered to be a (second) standard of care (Chester et al., 2004). Von der Maase et al. (2000), in a randomized phase III trial involving patients with advanced bladder cancer, has demonstrated that the gemcitabine/cisplatin regimen shows similar efficacy to MVAC, but with superior safety and tolerability profile.

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP) is one of the most potent antitumor agents due to its ability to cross-link to DNA and cause severe lesions leading to apoptosis, especially in highly replicating cells such as tumor cells (Siddik, 2003). Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) is a deoxycytidine analog with clinical activity against a variety of tumors (Nabhan et al., 2001; Bass et al., 2002). This drug is phosphorylated into its active dFdCTP metabolite and incorporated into cellular DNA blocking further elongation of the strand (Galmarini et al., 2001). Some authors have suggested that deoxycytidine kinase (enzyme involved in the rate-limiting phosphorylation step to the monophosphate form) is a limiting factor for the cytotoxic activity of gemcitabine (Toschi et al., 2005).

Mutations in *TP53* tumor suppressor gene are frequently found in bladder cancer. Current ideas suggest that this gene functions as a central control checkpoint in response to DNA damage induced by a variety of agents, including cisplatin and gemcitabine. Briefly, p53 transactivates expression of the CDK inhibitor p21 WAF1/Cip1, which regulates progression of cells past the G1/S checkpoint by inhibiting the cyclin D1-CDK4/6 and cyclin E-CDK2-mediated phosphorylation of Rb protein-E2F complexes (Levine, 1997). The *TP53* gene

controls a broad range of cellular responses. Induction of a transient (cell cycle arrest) or a permanent (senescence) block of cell proliferation, or the activation of cell death pathways in response to genotoxic stress comprise the major arms of the survival-death axis governed by *TP53* (Kim et al., 2009). Attempts to correlate the chemoresistance of tumors to the status of *TP53* have shown that the therapeutic response not only depends on the type of *TP53* alteration and the type of treatment, but also it is largely cell/tissue specific and depends on the study designed to evaluate the therapeutic response (proliferation, apoptosis, clonogenic survival) (Weller, 1998). Some authors have demonstrated that cancer cells with mutated *TP53* are more resistant to cisplatin than the wild type (wt) cells (Kartalou & Essigmann, 2001). Moreover, Kannan et al. (2001) have shown that silencing of *TP53* in TGCT testicular tumor cell line protected the cells from cisplatin-mediated toxicity. On the other hand, Chen et al. (2000) have found that inactivation of *TP53* by transfection of *TP53* normal colon cancer cells with the human papillomavirus E6 gene resulted in decreased gemcitabine mediated cytotoxicity and apoptosis. In contrast, Kielb et al. (2001) have found that *TP53* function does not impact gemcitabine cytotoxicity in TCC cells.

Thus, in an effort to improve clinical outcomes, chemotherapy has been largely investigated. Since cisplatin and gemcitabine are two antineoplastic agents increasingly used to treat bladder cancer, the aim of this study was to investigate the effects of these two drugs on the apoptotic index and cell cycle distribution in urinary bladder TCC cell lines with different *TP53* status (RT4, with wt-*TP53*; 5637 and T24, with mutated *TP53*). Cytotoxicity, cell survival and clonogenic survival were also examined.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines, culture conditions and chemicals

The established cell lines RT4 (grade 1), 5637 (grade 2) and T24 (grade 3) from human bladder TCC were obtained from the Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The 5637 cells contain two mutations, one at codon 280 (Arg>Thr) and other at codon 72 (Arg>Pro) (Rieger et al., 1995; Cooper et al., 1994); the T24 cells display a *TP53* allele encoding an in-frame deletion of tyrosine 126 (Cooper et al., 1994); no specific mutations are detected in RT4 cell line (Cooper et al., 1994). The cells RT4 and T24 were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) and the cells 5637 were maintained in RPMI (Sigma-Aldrich), both supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab), 100 U/ml penicillin G (Sigma-Aldrich), 100U/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) and 1% Kanamicin Sulfate (Amresco) at 37°C and 5% CO₂. The antineoplastic drugs gemcitabine (dFdC, Gemzar) and cisplatin (CDDP) were obtained from Eli Lilly Laboratory and Sigma-Aldrich, respectively. Ultra-pure and esterilized water was used for dilutions.

Cytotoxicity and cell survival assays

Cytotoxicity and cell survival induced by cisplatin and gemcitabine and on the three cell lines were determined using the XTT assay (Cell Proliferation Kit II – Roche Diagnostics). Briefly, cells were seeded in 12-well culture plates (1.5×10^4 and 6×10^4 cells/well for cellular survival and cytotoxicity assays, respectively). Twenty-four hours later, cells were treated with different concentrations of cisplatin (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 and 50 uM), gemcitabine (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 200 uM) or simultaneously with the two drugs (0.5 uM of cisplatin + 0.78 uM of gemcitabine, 0.5 uM of cisplatin + 1.56 uM of gemcitabine, 1.0 uM of cisplatin + 0.78 uM of gemcitabine, 1.0 uM of cisplatin + 1.56 uM of gemcitabine). After 24h incubation, cells were washed with Hank's solution (0.4 g KCl, 0.06 g KH₂PO₄, 0.04 g Na₂HPO₄, 0.35 g NaHCO₃, 1 g glucose, 8 g NaCl, H₂O q.s.p 1000 ml), and complete fresh medium was added. Cell sampling was 24h and 5 days after treatment for cytotoxicity and cellular survival assays, respectively. A 50 µl aliquot of the XTT test solution (1ml XTT-labelling / 20ul electron-coupling reagents) was added to each well at the end of the experiment. After another 90 min incubation, the absorbance was measured at a wavelength of 492 nm and a reference wavelength of 690 nm (Scudiero et al., 1988).

Clonogenic survival assay

For determination of the clonogenic ability following treatments, cells were plated at a density of 1×10^6 cells/ 25cm^3 -culture flasks. After 24h incubation, different concentrations of cisplatin (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 μM), gemcitabine (0.78, 1.56, 3.12, 6.25 μM) or combinations of both (0.5 μM of cisplatin + 0.78 μM of gemcitabine, 0.5 μM of cisplatin + 1.56 μM of gemcitabine, 1.0 μM of cisplatin + 0.78 μM of gemcitabine, 1.0 μM of cisplatin + 1.56 μM of gemcitabine) were added to the culture. After other 24h period, cultures were rinsed with Hank's solution, trypsinized, and about 1000 cells were plated in 25cm^3 -culture flasks and allowed to grow for 15 days to form colonies. Cells were stained with Giemsa and the number of colonies of 50 or more cells was counted.

Cell cycle analysis

To determine cell cycle distribution, 1×10^6 cells were plated in 25cm^3 -culture flasks, incubated for 24h and treated with 1.0 μM of cisplatin, 1.56 μM of gemcitabine or with the combination of both (1.0 μM of cisplatin + 1.56 μM of gemcitabine) for 24h. After treatments, cells were washed in Hank's solution and complete fresh medium was added. Cells were sampling at time 0 (just after the washing), 24, 48 and 72h incubation. An aliquot of 5×10^5 cells were scored to analyze the cell cycle using the CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson). Instrument performance and quality were done using the DNA QC Particles Kit (Becton Dickinson). Cells were analyzed by FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson), and the distribution in the cycle phases was calculated using the Modfit 2.0 cell cycle analysis software.

Apoptosis

Quantitative assessment of apoptosis was done using an annexin V assay kit (BD Biosciences). Briefly, cells were incubated and treated like described before (cell cycle analysis). Cells were sampling at 24, 48, and 72h of experiment. About 1×10^5 cells were resuspended in binding buffer (10mmol/L HEPES/NaOH pH7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl_2) and stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and 7-AAD, at room temperature, for 15 min in the dark. Cells were immediately analyzed in an FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software. Data from 10,000 cells were collected for each data file. The definition of cellular status was as following: unstained cells were classified as "live"; cells stained for annexin V only were "early apoptotic"; cells stained for both annexin V and 7-AAD were "late apoptotic"; cells

stained for 7-AAD only were “dead” (Barton et al., 2004; Kuo et al., 2006; Xu et al., 2006; Wang et al., 2008).

Combination index (CI)

In the clonogenic survival assay, the combination index was used to analyze the interaction (antagonistic, additive and synergistic effects) between the two antineoplastic drugs. The CI for the fractions killed was calculated using the following equation described by Chou et al. (1994): $CI = d_1/D_1 + d_2/D_2 + \{(d_1/d_2)/(D_1/D_2)\}$, where D1 and D2 are the doses of drug 1 and 2 which by themselves result in a given fraction killed, and d1 and d2 are the doses resulting in the same fraction killed in combination. The CI values were interpreted as: antagonistic effect if $CI > 1.2$; additive effect if $1.2 > CI > 0.8$; synergistic effect if $CI < 0.8$.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software SAS, v.9.1.3 (*Statistical Analysis System, SAS Institute Cary, NC*). For the cytotoxicity and cellular survival assays, data were compared using factorial analysis adjusted to Tukey test, considering the time and concentration effects, and time *versus* concentration. For the clonogenic survival, analysis was done based on the Poisson distribution; apoptosis was analyzed using the delineation in parcel divided in the time adjusted to Tukey test. Cell cycle analysis was performed using a delineation adjusted in factorial based on a binomial distribution. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Citotoxicity and cell survival assays

In the citotoxicity assay, gemcitabine, cisplatin or the combinations of both did not inhibit the growth of RT4, 5637 and T24 cell lines (Figure 1). However, the results from the cell survival assay showed statistically significant lower percentages of survival when RT4 cells were treated with cisplatin at concentrations of 20 and 50 μM , and with all of the concentrations of gemcitabine (0.78-200 μM); when 5637 cells were treated with all the concentrations of cisplatin (0.5-50 μM); and when T24 cells were treated with 5, 10, 20 and 50 μM of cisplatin and with all of the concentrations of gemcitabine, except with 0.78 μM . RT4 cells had the highest level of survival following cisplatin treatment. All the drugs combinations induced decrease of the percentage of survival in the three cell lines (Figure 2).

Clonogenic survival assay

Clonogenic survival assay revealed significant and dose-dependent cell death in the all three cell lines treated with cisplatin, and in 5637 and T24 cells treated with gemcitabine. The RT4 cells were the most sensitive to the treatment with gemcitabine. For the combined protocols reduced percentage of clonogenic survival were observed in the three cell lines (Figure 3).

Cell cycle and apoptosis (Figure 4 and 5 respectively)

In order to determine the role of the antitumor drugs on cell cycle, the cell lines were treated with 1.0 μM of gemcitabine. G1 cell-cycle arrest at the time 0h of experiment was observed in RT4 and T24 cells, and at 24h in 5637 cells. After the arrest, cells did not enter in cycle again. This effect was observed until 72 h after treatment (Data not shown). Figure 4 also shows the effects of 0.5 μM of cisplatin on the cell cycle of the three cell lines. The drug caused a delay, with accumulation of cells in S phase at the time 0 in RT4 cells and S and G2 phases at 24h of experiment in 5637 cells. A sensitive G1 cell-cycle arrest was observed in 5637 line only after 24h. For T24 cell line, it was detected an accumulation at G2 phase in the time 0, with posterior sensitive accumulation in G1 at the time 24h. Data from treatment with the combination 1.0 μM of cisplatin + 1.56 μM of gemcitabine showed G1 cell-cycle arrest at the time 0h in RT4 and T24 cells, and at the time 24h in 5637 cells. Cells never entered in cycle again, at least until 72 h after treatment (Data not shown). Tetraploid cells were observed in culture of RT4 line after all the treatments, but not in controls.

Cisplatin induced apoptosis only in RT4 cells at the time 48h (12.84%) and 72h (16.68%) of experiment. On the other hand, gemcitabine besides to induce apoptosis in RT4 line at the time 24h (15.34%), 48h (87.58%) and 72h (92.16%), it also induced in 5637 cells from the time 48 until 72h (13.9 and 19.92%, respectively), and in T24 cells at the time 72h (19.92%). Following treatment with the combination of drugs, increased cell apoptosis was observed from 24 until 72h in RT4 (14.1, 80.71 and 87.72%, respectively) and 5637 cells (17.74, 19.02 and 20.49%, respectively), and at the time 72h in T24 cells (31.05%). Using the combination index, the results showed a synergistic interaction between gemcitabine and cisplatin for the three cell lines.

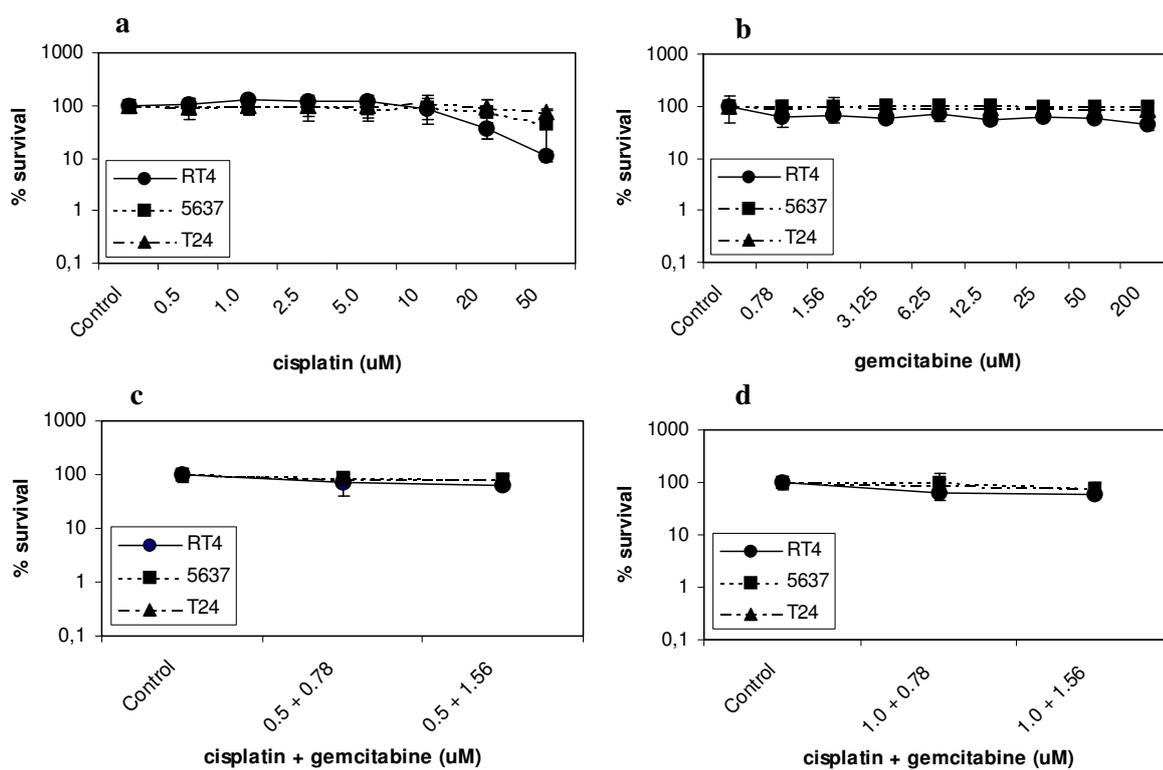


Figure 1: Cytotoxic effect in RT4, 5637, and T24 cell lines after treatment with different concentrations of cisplatin (a), gemcitabine (b) and combinations of both (c, d). Data are percentage of cell survival 24h after treatment.

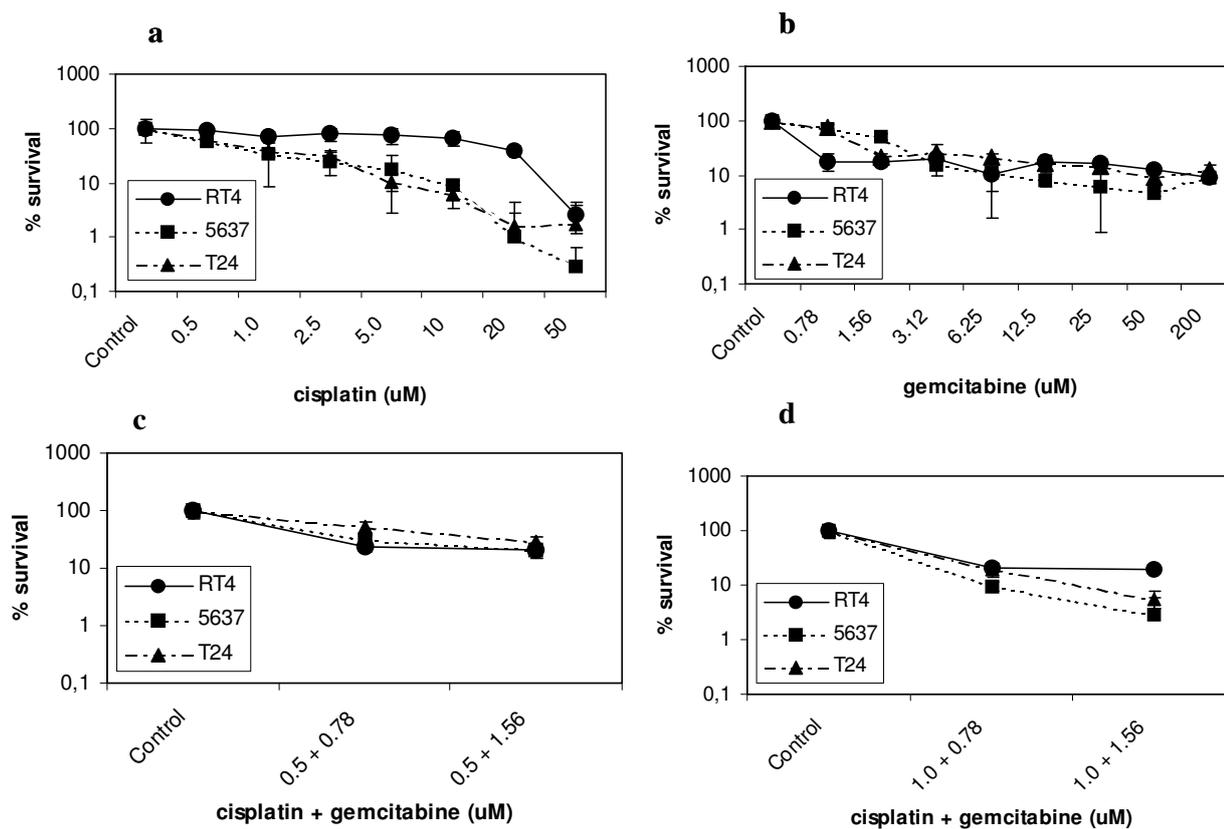


Figure 2: Survival curves for RT4, 5637, and T24 cell lines after treatment with different concentrations of cisplatin (a), gemcitabine (b) and combinations of both (c, d). Data are percentage of cell survival 5 days after treatment.

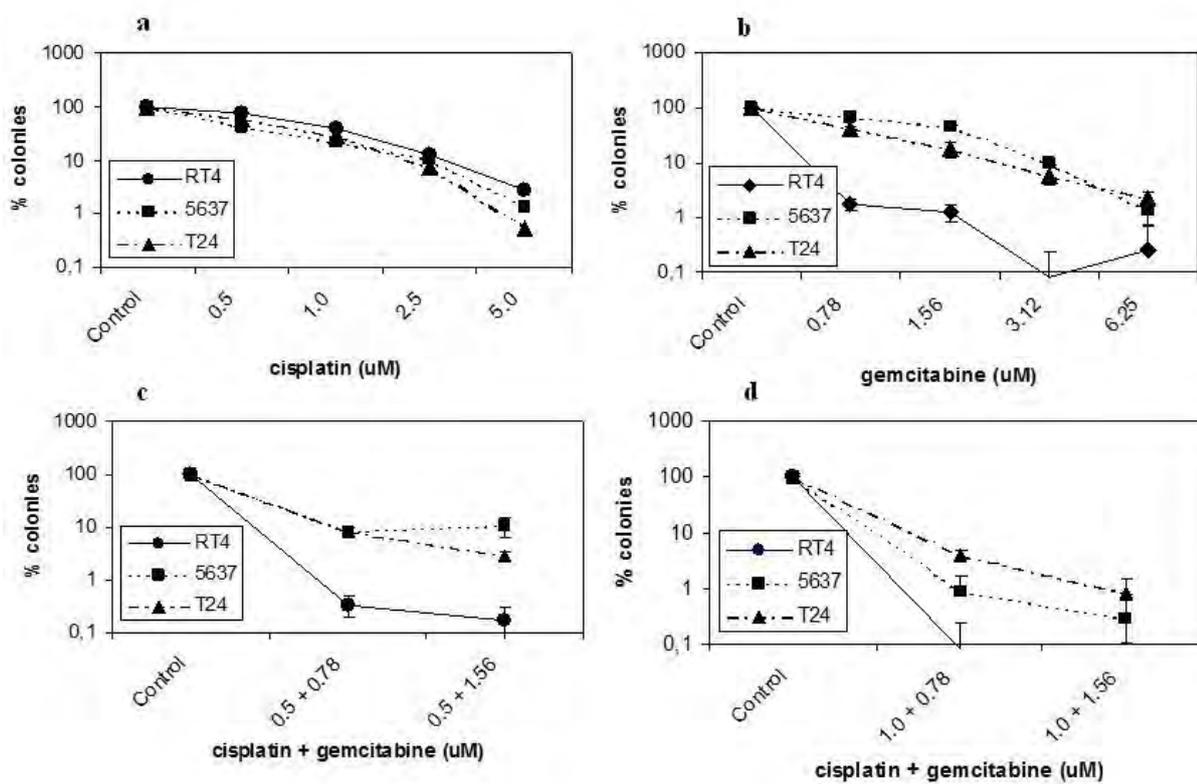


Figure 3: Clonogenic survival profiles for RT4, 5637, and T24 cell lines treated with different concentrations of cisplatin (a), gemcitabine (b) and combinations of both (c,d). Data are percentage of colonies counted 15 days after the treatment.

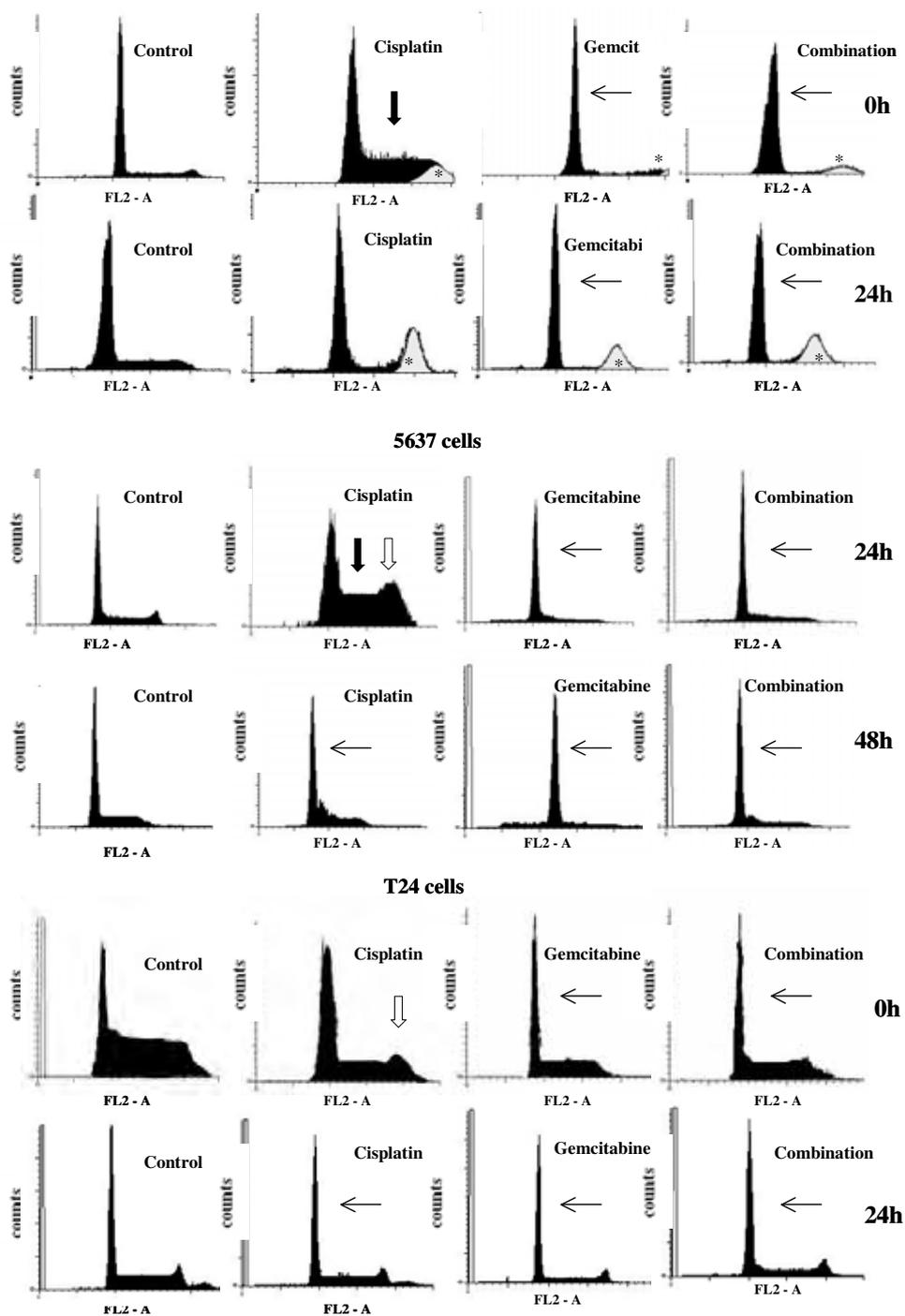


Figure 4: Representative DNA histograms (flow cytometry) of the RT4, 5637 and T24 cell lines treated with 1.0 μM of cisplatin, 1.56 μM of gemcitabine or with the combination of both. The arrows mean increased number of cells in: G0/G1(\leftarrow), S (\downarrow), G2/M (\Downarrow) phases. The asterisks represent tetraploid cells.

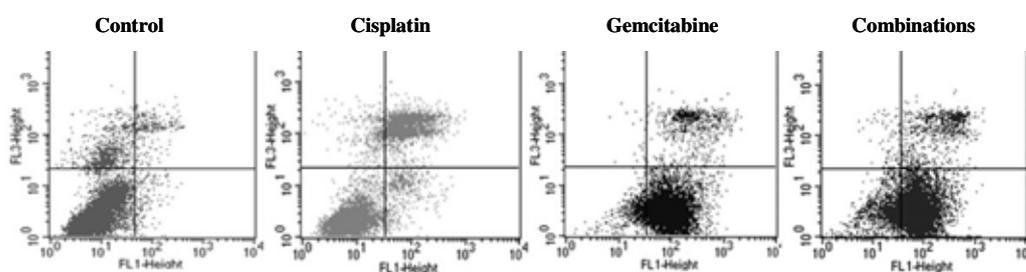
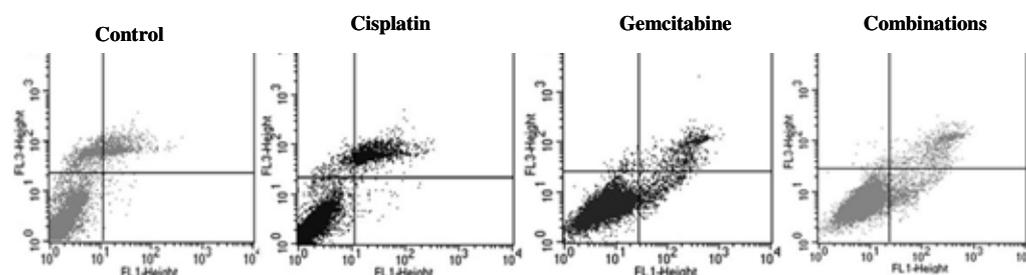
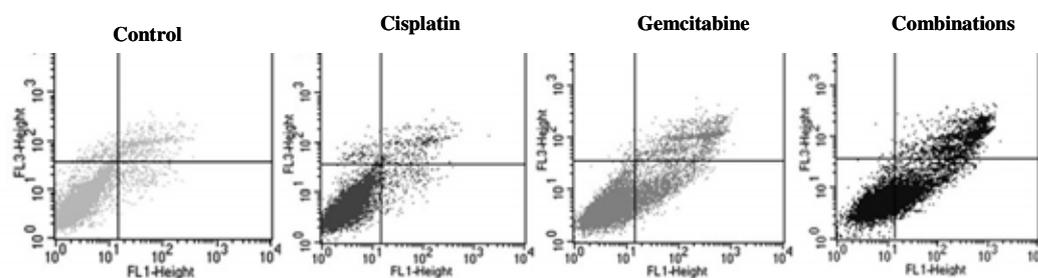
RT4 cell line (48h after the treatments)**5637 cell line (72h after the treatments)****T24 cell line (72h after the treatments)**

Figure 5: The graphs show apoptotic index for RT4 cells treated with 1.0 μ M of cisplatin, 1.56 μ M of gemcitabine or with combination of both, and for 5637 and T24 cells treated with 1.56 μ M of gemcitabine and combination of both. FL1-H indicates annexin V-FITC fluorescence; FL2-H, 7-AAD fluorescence.

DISCUSSION

Mutation in *TP53* gene is one of the most common genetic abnormalities found in bladder cancer. The effect of *TP53* mutations and cell response to chemotherapy is complex. Hypothetically, *TP53* mutated cells would be more resistant to chemicals because they are less able to undergo apoptosis. However, cellular induction of apoptosis does not occur by a single *TP53* dependent pathway. Conversely, recent findings have yielded somewhat unexpected insights concerning the preponderance of the survival-promoting effects of wt *TP53* in cancer cells, a rather undesired property from the therapeutic point of view (Kim et al., 2009). In bladder cancer, the interaction between *TP53* status of the primary tumor and response to chemotherapy is not well defined (Kielb et al., 2001).

In spite of efforts to determine the effects of *TP53* inactivation on the response of cancer cells to therapeutic agents, the results are still conflicting, with some studies indicating enhanced sensitivity and others increased resistance to the same compounds (Blandino et al., 1999). Most of the studies rely on measurements of growth inhibition at a specific time (Bunz et al., 1999; Lin et al., 2001) to claim that a cell line expressing or not *TP53* is more or less sensitive to the same anticancer drug. In the present study, three different human bladder cancer cell lines, RT4 cell expressing wt *TP53* and 5637 and T24 cells containing mutations in *TP53* gene were used to investigate the relationship between *TP53* status and the sensitivity to the antitumor drugs cisplatin and gemcitabine.

Cisplatin has similar properties to those of alkylating agents, forms a variety of DNA adducts, but the specific lesion responsible for cisplatin cytotoxicity is undefined. About 90% of all adducts formed *in vitro* are 1,2-intrastrand cross-links and led to frequent replication arrests and formation of daughter strands gaps and double-strand breaks (Huitema et al., 2000; Zdraveski et al., 2000). Cisplatin is not cycle-phase specific (Roberts and Pascoe, 1972) and adducts may inhibit DNA replication, transcription and, ultimately, cell division (Weiss and Christian, 1993). Present data showed a G1 temporary arrest in *TP53* mutated cell lines after cell-cycle delay caused by cisplatin. It has been showed that in certain tumor contexts *TP53* protects cells from cisplatin toxicity due to induction of G1 arrest (Bunz et al., 1999). However, Kannan et al. (2001) has shown that silencing of *TP53* in testicular tumor cell line protected the cells from cisplatin-mediated toxicity (Kannan et al., 2001). Moreover, many studies have described cell cycle effects induced by cisplatin, such as the delayed progression

through S phase and the block in G2M being the principal perturbations (Sorenson et al., 1990).

Other data from our study showed low percentages of cell survival and clonogenicity, when cultures were treated with cisplatin. RT4 cells seem to be the most resistant, although apoptosis has been observed. Several studies have demonstrated the increased resistance of *TP53* mutant cancer cell lines to cisplatin (Eliopoulos et al., 1995; Lenz et al., 1998). However, other investigators have found that most head and neck squamous cell carcinoma cell lines with a *TP53* mutation have increased sensitivity to cisplatin, whereas those with wt *TP53* tend to be more resistant (Brandford et al., 2003). Cytotoxicity (24h) was not observed for any of the cell lines used in this study. In agreement, Gonçalves et al. (2006) has showed that the cisplatin was not cytotoxic to Vero cells, but a transient proliferative effect was observed at 24h. According to Eastman (1990), this observation could be explained based on the fact that, after DNA damage caused by the formation of cisplatin-DNA adducts, genotoxic stress induces numerous signaling pathways that can influence cell growth and cytotoxicity, including members of the MAP kinase pathways. These pathways are parallel cascades of structurally related serine/threonine kinases that integrate numerous extracellular signals involved in the regulation of cell proliferation, differentiation and survival. Therefore, MAP kinase activation might partially protect cells from cisplatin cytotoxicity (Seger and Krebs, 1995).

Some authors have related that *TP53* is activated by genotoxic drugs, capable of inducing apoptosis, and widely regarded as a mediator of chemotherapy-induced cell death. In our study, apoptosis induced by cisplatin was not observed in *TP53* mutated cells, although low percentages of survival were clear. Some studies have supported the theory that *TP53* mutations result in loss of G1/S checkpoint control and in cell inability to initiate apoptosis in response to DNA damage (Gallagher et al., 1997). Other data have showed that higher dose of cisplatin is required to induce apoptosis in *TP53* mutated ovarian cancer cells than in ovarian cancer cells with wild-type *TP53* (Asselin et al., 2001), and that cisplatin-induced growth arrest in human cancer cells has characteristics of senescence rather apoptosis (Wang et al, 1998). The senescence-associated β -galactosidase was expressed following cisplatin exposure, but there was no change in *TP53*, *p21* or *p16* expression (Wang et al., 1998). The authors believe that cancer cells lacking *TP53* function can also be killed by cisplatin via a *TP53*-independent mechanism with similarities to replicative senescence. On the other hand,

Yip et al. (2006), using cells with wt *TP53* gene, have observed that in presence of cisplatin there is induction of *Bcl-xl*, and apoptosis takes place via a caspase-3 independent.

Gemcitabine activity in relation to *TP53* status has been less thoroughly investigated in bladder cancer or otherwise. Chen et al. (2000) have found that inactivation of *TP53* by transfection of *TP53* normal colon cancer cells with the human papillomavirus *E6* gene resulted in decreased gemcitabine mediated cytotoxicity. In contrast, Kielb et al. (2001) found that *TP53* function did not impact gemcitabine cytotoxicity in TCC cells. In our study, RT4 cells were the least resistant in the clonogenic assay, and G1 phase arrest was observed for the three cell lines. It has been showed that elevated expression of *CDKN1B* may cause G1 arrest of cells (Toshimitsu et al., 2006). Literature reports apparent discrepant results about the effect of gemcitabine on cell cycle. Perhaps, the different concentrations used might explain these findings. Using bromodeoxyuridine labeling, Merlin et al. (1998) have observed that low concentration (IC50 values) of gemcitabine caused an arrest in the early S phase. In contrast, higher concentration induced an arrest in the G1 phase of the cell cycle.

Regarding to apoptosis, we found high percentages in gemcitabine-treated RT4 cells. However, lower percentages were observed in both *TP53* mutated cells at different times of the experiment. Especially the role of gemcitabine in the induction of apoptosis is still unclear. It has been reported that the incorporated gemcitabine can be recognized by p53 protein and DNA-dependent protein kinase, which might result in apoptosis. In a high percentage of tumors, mutation in *TP53* may explain relative resistance to gemcitabine. Some authors have demonstrated that inactivation of *TP53* results in decreased gemcitabine mediated apoptosis (Chen et al., 2000). Giovannetti et al. (2007) have showed that the treatment of human lymphoid cells with gemcitabine induced apoptosis. On the other hand, Bold et al. (1999) have demonstrated that pancreatic cancer cell lines that express variable amounts of Bcl-2 are associated with a significant increase in the gemcitabine-induced apoptosis. An additional and crucial determinant of tumor response to gemcitabine seems to be ribonucleotide reductase, whose over-expression is involved in gemcitabine chemo-resistance in various tumor cell lines (Mansson et al., 1999). Besides to be important, the actual site of mutation in *TP53* gene could explain the observed differences in apoptosis and cell cycle between the two *TP53*-mutated cell lines. Different *TP53* mutations induce different downstream effects. Certain mutants activate *p21*, but not *Bax* gene; others can affect cell-cycle rather than apoptosis indices (Friedlander et al., 1996; Slaton et al., 2001).

When the combination of cisplatin and gemcitabine was used, we observed a synergistic effect, independent on the *TP53* status. G1 phase arrest was observed in all the three cell lines; apoptosis was detected after 24h in 5637 cell line, and in higher percentage in T24 cells after 72h. Low survival was also observed in the cell survival and clonogenic survival assays for RT4, 5637 and T24. Crul et al. (2003) have demonstrated that cisplatin followed by gemcitabine treatment was the most cytotoxic sequence in CHO cells. These authors have described that the synergism between cisplatin and gemcitabine involves homologous recombination (HR) and in a minor way nucleotide excision repair (NER). Hypothetically, the involvement of HR and NER might be explained by incorporation of gemcitabine at the gaps left behind after platinum-DNA adduct removal. In cisplatin interstrand-DNA adduct repair (performed by HR), two guanines on opposite strands are excised. Hence, in the subsequent repair steps this must always be followed by incorporation of cytidine, which is a nucleotide gemcitabine competes. Same authors have also reported that base excision repair (BER), NER, HR and NHEJ (non-homologous end joining) are probably not capable of efficiently modulate the effects of gemcitabine on DNA. Even cisplatin followed by gemcitabine had synergistic effect in human ovarian and lung cancer cell lines, simultaneous administration or the reversed order have also been reported as most cytotoxic (Theodossiou et al., 1998; van Moorsel et al., 1999).

In conclusion, our data showed that bladder TCC cells with the wt *TP53* are more sensible to apoptosis than *TP53* mutated cells when treated with cisplatin or gemcitabine. However, when drugs were given in combinations, low percentages of survival occurs independent on *TP53* status. It should be emphasized that chemotherapy can be effective despite of tumor-associated *TP53* mutations. Therefore, since high concentrations of cisplatin are toxic to the organism, the synergy obtained with low concentrations of both drugs may have clinical relevance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. José Eduardo Corrente for the statistical analyses. This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3 dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:1862-8.
- Barton BE, Karras JG, Murphy TF et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 11-20.
- Bass AJ, Gockerman JP, Hammett E et al. Phase I evaluation of prolonged-infusion gemcitabine with irinotecan for relapsed or refractory leukemia or lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:2995-3000.
- Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: Differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999; 18:477-85.
- Bold RJ, Chandra J, McConkey DJ. Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content. *Ann Surg Oncol* 1999; 6:279-85.
- Brandford CR, Zhus S, Ogawa H et al. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *HeadNeck* 2003; 25:654-61.
- Bunz F, Hwang PM, Torrance C et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104:263-9.
- Chester JD, Hall GD, Forster M et al. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer – current controversies and future directions. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:343-58.
- Chen M, Hough AM, Lawrence TS. The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 369-74.
- Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D et al. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res*, 1994; 6:569-79.
- Crul M, van Waardenburg RC, Bocxe S. DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:275-82.
- Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 1990; 2:275-80.
- Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J et al. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* .1995; 11:1217-28.
- Friedlander P, Haupt Y, Prives C et al. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4961-71.
- Gallagher WM, Cairney M, Schott B et al. Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. *Oncogene* 1997; 14:185-93.
- Gallagher DJ, Milowsky MI, Bajorin DF. Advanced Bladder Cancer: Status of First-line Chemotherapy and the Search for Active Agents in the Second-line Setting. *Cancer* 2008;113:1284–93.
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 2001; 15:875-890.
- Giovannetti E, Mey V, Loni L et al. Cytotoxic activity of gemcitabine and correlation with expression profile of drug-related genes in human lymphoid cells. *Pharmacol Res* 2007; 55:343-9.
- Gonçalves EM, Ventura CA, Yano T, Macedo MLR, Genari SC. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. *Cell Biol International* 2006; 30:485-94.
- Huitema ADR, Smits KD, Mathot RAA, et al. The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2000; 11:515-33.
- Kannan K, Amariglio N, Rechavi G et al. (2001). *Oncogene* 20, 2225-34.
- Kartalou M, Essgmann JM. Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478:23-43.

- Kielb SJ, Nikhil L S, Rubin MA et al. Functional p53 mutation as a molecular determinant of paclitaxel and gemcitabine susceptibility in human bladder cancer. *J Urol* 2001; 166:482-7.
- Kim E, Giese A, Deppert W. Wild type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77:11– 20.
- Kirkali, Z; Chan, T; Manoharan et al. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66:4–34.
- Kuo YC, Kuo PL, Hsu YL et al. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sci* 2006; 78: 2550-57.
- Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res.* 1998; 4:1243-1250.
- Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-31.
- Lin X, Ramamurthi K, Mishima M et al. P53 modulates the effect of loss of DNA mismatch repair on the sensitivity of human colon cancer cells to the cytotoxic and mutagenic effects of cisplatin. *Cancer Res* 2001; 61:1508-16.
- Mansson E, Spasokoukotskaja T, Sällström J et al . Molecular and biochemical mechanisms of fludarabine and cladribine resistance in a human promyelocytic cell line. *Cancer Res.* 1999; 59:5956-63.
- Merlin T, Brander G, Hess RD. Cell cycle arrest in ovarian cancer cell lines does not depend on p53 status upon treatment with cytostatic drugs. *Int J Oncol* 1998; 13:1007-16.
- Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J et al. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 2000;164:680-4.
- Nabhan C, Krett N, Gandhi V et al. Gemcitabine in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:514-21.
- Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: Risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J* 2006; 99:1256–63.
- Rieger KM, Little AF, Swart JM et al. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* 1995; 72:683-90.
- Roberts JJ, Pascoe JM. Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour platinum compounds. *Nature* 1972; 235:282-4.
- Scudiero, PA, Shoemaker R H, Paull KD et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:4827-33, 1988.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9:726-35.
- Siddk ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265-79.
- Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP. P53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology* 2001; 57:852-9.
- Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:749-55.
- Theodossiou C, Cook JA, Fisher J et al. Interaction of gemcitabine with paclitaxel and cisplatin in human tumor cell line. *Int J Oncol* 1998; 12:825-32.
- Toschi L, Finocchiaro G, Gioia, V. Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncology*, 2005; 1:7-17, 2005.
- Toshimitsu H, Iizuka N, Yamamoto K et al. Molecular features linked to the growth inhibitory effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *Oncology reports* 2006; 16:1285-91.
- van Moorsel CJ, Pinedo HM, Veerman G et al. Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80:981-90.
- von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 2000; 18:3068-77.

- von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4602-8.
- Wang X, Wong SC, Pan J et al. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58:5019-22, 1998.
- Wang CCC, Chiang Y-M, Kuo P-L et al. Norsolorinic acid inhibits proliferation of T24 human bladder cancer cells by arresting the cell cycle at the G₀/G₁ phase and inducing a fas/membrane-bound fas ligand-mediated apoptotic pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:1301-8.
- Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs* 1993; 46:360-77.
- Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res* 1998; 292:435-45.
- Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O et al. Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66:6657-64.
- Yip HT, Chopra R, Chkrabarti R et al. Cisplatin-induced growth arrest of head and neck cancer cells correlates with increased expression of p16 and p53. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:317-26.
- Zdraveski ZZ, Mello JA, Marinus MG et al. Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chem Biol* 2000; 7:39-50.
- Zeegers MP, Tan FE, Dorant E et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000; 89:630-9.

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER
DE BEXIGA SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM AGENTES
QUIMIOTERÁPICOS**

Glenda Nicioli da Silva¹; Danielle Aparecida Rosa de Magalhães²; Cláudia Macedo²; Elza Tieme Sakamoto-Hojo^{3,4}, Geraldo Aleixo Passos^{2,5}, Daisy Maria Fávero Salvadori¹.

¹Laboratório de Toxicogenômica & Nutrigenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, SP, Brasil; ²Grupo de Imunogenética Molecular, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil; ³Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina -USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil; ⁴Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil; ⁵Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Correspondência para o autor: Glenda Nicioli da Silva, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/nº, CEP 18618-917, Botucatu, SP, Brasil (e-mail:nicioli@fmb.unesp.br). Telefone: +55-14 38117263.

Palavras-chave: carcinoma de células transicionais de bexiga, cisplatina, gencitabina, expressão gênica

Trabalho a ser enviado para a revista *Carcinogenesis*

RESUMO

Introdução: os agentes químicos utilizados na terapia do câncer estão frequentemente associados ao bloqueio ou retardo do ciclo celular, à ativação ou desativação de mecanismos de reparo do DNA e à apoptose. Entretanto, devido à complexidade dos sistemas biológicos, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares responsáveis pelas atividades dos antineoplásicos. Dessa maneira, os estudos de expressão gênica têm se mostrado promissores para o entendimento das respostas celulares e dos mecanismos de regressão de neoplasias frente à exposição a agentes químicos. O presente estudo objetivou avaliar os padrões de expressão gênica em células de carcinoma transicional (CCT) de bexiga, expostas ou não às drogas cisplatina e gencitabina, a fim de contribuir para o entendimento das atividades quimioterápicas e, conseqüentemente, dos mecanismos relacionados à involução de neoplasias uroteliais. **Materiais e Métodos:** a análise de expressão gênica em linhagens celulares RT4 (grau tumoral 1 e com gene *TP53* selvagem), 5637 (grau 2, *TP53* mutado), e T24 (grau 3, *TP53* mutado), submetidas a tratamento com os agentes quimioterápicos cisplatina e gencitabina, foi realizada por meio da técnica de microarranjos de cDNA. **Resultados:** Os agrupamentos hierárquicos de expressão gênica para cada linhagem celular frente aos tratamentos químicos mostraram a modulação de genes relacionados, principalmente, à apoptose, ao reparo de danos no DNA e a constituintes celulares. Nas três linhagens, o tratamento combinado cisplatina/gencitabina foi o que causou maior alteração no padrão de expressão gênica. Quando as linhagens celulares, sem qualquer tratamento, foram comparadas, verificou-se que o padrão de expressão das células de grau 1 (RT4) era mais semelhante àquele da linhagem de grau 3 (T24). **Conclusão:** os resultados permitem sugerir que o tratamento combinado parece ter sido o mais efetivo, independentemente do grau do tumor, apesar de que alguns genes relacionados, por exemplo, a oncogênese e à progressão do tumor terem sido inversamente modulados pelo tratamento.

INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga ocupa a quarta posição entre as neoplasias mais comuns no mundo ocidental (Kirkali et al., 2005), sendo que os carcinomas de células transicionais (CCT) compreendem cerca de 90% dos cânceres de bexiga, com os 10% restantes sendo representados por carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequenas e, raramente, tumores derivados do mesênquima (Chester et al., 2004). Os CCT têm sido classificados em dois grupos com comportamentos distintos e diferentes perfis moleculares: (a) tumores de baixo grau (que são sempre papilares e normalmente superficiais); e (b) tumores de alto grau (que são papilares ou não papilares e frequentemente invasivos) (Knowles et al., 2001). Entre as mais comuns anormalidades genéticas encontradas no câncer de bexiga encontram-se as alterações no gene *TP53* que caracterizam, principalmente, o CCT de alto grau (Baithun et al., 2001). Sabe-se que este gene funciona como *checkpoint* na resposta a danos no DNA induzidos por vários agentes e tem papel importante na indução da apoptose (Kim et al., 2009).

A recorrência tumoral é um fenômeno frequentemente observado em CCT de bexiga. Aproximadamente 70% dos pacientes com tumores superficiais têm recorrências, e cerca de 10% a 20% progridem para invasão muscular (Smith, 1999). Os procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida (Reznikoff et al., 2000) e fazem com que os pacientes sejam considerados grupo de risco para o desenvolvimento neoplásico *de novo* (Qureshi et al., 2000) e susceptíveis a recorrências (Hisataki et al., 2001). Dentre as formas de tratamento, a quimioterapia é bastante utilizada para os CCT. Os sinais primários da ação das drogas antineoplásicas são as alterações no DNA, que levam a eventos moleculares que podem resultar em bloqueio na progressão do ciclo celular e apoptose, e que são respostas essenciais à manutenção da integridade genética da célula normal (Amudson et al., 1999). Por outro lado, a maior causa do insucesso no tratamento do câncer é a resistência aos medicamentos antitumorais. A resistência pode ocorrer para drogas isoladas, ou para tratamentos combinados com vários compostos, que apresentam diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação (Gottesman et al., 2002).

Os protocolos atualmente adotados para a quimioterapia do câncer de bexiga incluem o regime de multidrogas MVAC (metrotrexate, vinblastine, doxurubicina e cisplatina). Entretanto, novos medicamentos têm sido avaliados. Von der Maase et al. (2000) demonstrou

que o tratamento combinado com as drogas cisplatina e gencitabina mostraram eficácia similar ao tratamento MVAC, mas com níveis de tolerabilidade e segurança muito maiores. A cisplatina é uma substância que atua ligando-se covalentemente ao N7 de bases púricas formando ligações cruzadas em uma mesma fita ou, em menor frequência, entre as duas fitas da cadeia do DNA (Eastman, 1983). Tais ligações podem levar à formação de falhas e quebras de dupla fita de DNA, e promover uma variedade de respostas celulares, incluindo, por exemplo, a inibição da própria síntese do DNA (Mello et al., 1998). A gencitabina (2',2'-difluorodeoxicidina, dFdC), por sua vez, é um análogo estrutural da deoxicidina (dCTP), que é fosforilada intracelularmente pelas quinases-nucleosídeo a nucleosídeos ativos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP). A ação citotóxica da gencitabina parece estar relacionada à inibição da síntese do DNA pela dupla ação do dFdCDP e do dFdCTP, que têm como alvos o DNA e o RNA. O dFdCTP inibe a DNA polimerase e o dFdCDP inibe a ribonucleotídeo redutase, que é a única enzima responsável pela catalisação das reações que geram os deoxinucleosídeos trifosfatos para a síntese do DNA (Galmarini et al., 2001).

Uma vez que vários estudos demonstraram que os perfis de expressão gênica de linhagens celulares (Scherf et al., 2000; Szakacs et al., 2004) e tecidos de neoplasias primárias (Hofmann et al., 2002; Holleman et al., 2004) poderiam prever a resposta celular a um tratamento específico, a tecnologia dos microarranjos de cDNA ganhou grande destaque, oferecendo, principalmente, a oportunidade de diagnosticar a doença antes dos sintomas e sinais clínicos. Entretanto, a maioria das investigações se concentrou na classificação dos subtipos tumorais e prognóstico do paciente, ao invés da resposta à droga (Sorlie et al., 2001; van de Vijver et al., 2002; van't Veer et al., 2002). Cabe lembrar que, uma das questões mais críticas a ser ainda elucidada com respeito à quimioterapia é a necessidade de se estabelecer métodos para prever a eficácia, ou toxicidade das drogas antineoplásicas, em diferentes situações (Zembutsu et al., 2002). Já que a resistência a medicamentos antineoplásicos, o efeito tóxico ao paciente, e a recorrência tumoral em curto prazo permanecem entre os maiores obstáculos na quimioterapia do câncer de bexiga, torna-se relevante investigar o mecanismo de ação dos compostos quimioterápicos, a fim de se estabelecer marcadores que permitam entender a eficácia, ou não, dos protocolos utilizados. Desta maneira, o objetivo do estudo foi analisar os perfis de expressão gênica em larga escala em três linhagens celulares de CCT de bexiga (RT4, de tumor grau 1 e gene *TP53* selvagem; 5637, de grau 2 e *TP53* mutado; T24, de grau 3 e *TP53* mutado) após tratamentos com os antitumorais cisplatina e gencitabina.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens celulares e reagentes

As linhagens celulares tumorais RT4 (grau 1, *TP53* selvagem), 5637 (grau 2, *TP53* mutado) e T24 (grau 3, *TP53* mutado), estabelecidas a partir de bexiga urinária humana, foram obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. As células RT4 e T24 foram mantidas e cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) e as células 5637 foram mantidas em RPMI (Sigma-Aldrich), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina G (Sigma-Aldrich), 100U/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 1% de Sulfato de Kanamicina (Amresco) a 37°C e 5% CO₂. As drogas antineoplásicas gencitabina (dFdC, Gemzar) e cisplatina (CDDP) foram obtidas do Laboratório Eli Lilly e Sigma-Aldrich, respectivamente. Para as diluições, foi utilizada água ultra-pura.

As concentrações de 1 µM de cisplatina, 1,56 µM de gencitabina e 1 µM de cisplatina + 1,56 µM de gencitabina utilizadas para a análise de expressão gênica foram definidas em experimentos prévios de sobrevivência clonogênica, apoptose e ciclo celular. O tempo de tratamento com as drogas de 24h foi definido com base na literatura (Crul et al., 2003; Paulwels et al., 2003). O tratamento combinado resultou, no ensaio de sobrevivência clonogênica, em 0, 0,28 ± 0,49 e 0,81% ± 0,70% de colônias formadas em relação ao controle (células sem tratamento), respectivamente para as linhagens RT4, 5637 e T24; na análise do ciclo celular, tanto para as drogas isoladas como combinadas, foram observadas alterações logo após o término do tratamento de 24 h, ou seja, no tempo 0h do experimento, nas células RT4 e T24, e no tempo 24h após o término do tratamento nas células 5637. Para os experimentos de apoptose, no tratamento combinado não foram observados índices apoptóticos no tempo 0h em nenhuma das linhagens, todavia, no tempo 24h, foram observados 14,1%, 17,74% e 0%, respectivamente para as linhagens RT4, 5637 e T24. Com base em todos esses dados foram definidos os tempos de coleta das células para análise da expressão gênica pela técnica dos microarranjos de cDNA, ou seja, o tempo 0h para as linhagens RT4 e T24 e o tempo 24h para a linhagem 5637.

Extração de RNA e microarranjos de cDNA

A extração de RNA foi feita com o *kit mirVana miRNA Isolation* (Ambion) e seguindo as instruções do fabricante, e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose denaturante. A análise dos perfis de expressão gênica das células controle (sem

tratamento) e das tratadas com as drogas antineoplásicas foi realizada em lâminas de vidro com microarranjos contendo 4.500 sequências (em duplicatas) do *human IMAGE cDNA library Consortium* (<http://image.llnl.gov/image>), que foram gentilmente cedidas pela Dra. Catherine Nguyen (INSERM-CNRS, Marseille, França) e preparadas de acordo com o protocolo descrito por Hegde et al. (2000). As lâminas com os microarranjos foram preparadas usando o *Generation III Array Spotter* (Amersham-Molecular Dynamics), conforme instruções do fabricante. As sondas complexas de cDNA foram feitas a partir de amostras extraídas das células sem e com os diferentes tratamentos. A transcrição reversa foi realizada com 10 µg de RNA/amostra utilizando-se o *kit Scribe Post Labelling* (Amersham Biosciences) e *primers* oligodT₁₂₋₁₈. O *pool* de referência foi preparado com três linhagens celulares: glioma U343 MG-a, HeLa e células Jurkat, marcadas com Cy3, enquanto as amostras experimentais foram marcadas com Cy5. A amostra de referência foi usada como procedimento de normalização. A hibridação foi feita por 15h utilizando-se um sistema automatizado (*Automatic Slide Processor*, Amersham Biosciences). Os sinais da hibridação foram capturados por *scanner Generation III laser* (Amersham Biosciences).

Análise da expressão gênica

A quantificação da imagem gerada pelo *scanner Generation III laser* foi feita com o auxílio do *software Spot* (<http://spot.cmis.csiro.au/spot/>). A normalização dos dados foi feita com o *R statistical environment* (<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/userguide/usersguide.htm>). Os dados normalizados foram exportados e analisados utilizando-se o *software Multiexperiment Viewer (MeV)*, version 3.1 (<http://www.tm4.org/mev.html>), que processou as análises estatísticas e o agrupamento hierárquico não supervisionado. Inicialmente, a análise estatística foi feita utilizando-se ANOVA ($p \leq 0,10$). Posteriormente, o método SAM foi aplicado para aqueles genes diferentemente expressos e identificados pela ANOVA. Para a identificação de genes modulados foram realizadas comparações *multi-class* ($FDR \leq 0,05$).

As informações de localização e funções biológicas foram obtidas do S.O.U.R.C.E (<http://smd-www.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e FATIGO (<http://www.fatigo.com>).

RESULTADOS

As análises dos perfis de expressão gênica foram realizadas em duas etapas: inicialmente, foram utilizadas as três linhagens (RT4, 5637 e T24) de CCT de bexiga sem qualquer tratamento, a fim de identificar genes diferencialmente expressos entre os três tipos celulares; posteriormente, as diferentes linhagens foram analisadas individualmente após os respectivos tratamentos (1 μ M de cisplatina, 1,56 μ M de gencitabina e 1,0 μ M de cisplatina + 1,56 μ M de gencitabina), resultando em um agrupamento hierárquico para cada linhagem estudada.

O primeiro agrupamento hierárquico, ou seja, aquele que comparou as três linhagens celulares sem tratamento (controle), com FDR de 0,609% e delta de 0,583, apontou para 756 genes estatisticamente significativos. Pelo agrupamento hierárquico, percebe-se que a linhagem de grau 1 (RT4, tumor superficial) teve o padrão de expressão gênica semelhante à linhagem de grau 3 (T24, tumor invasivo). (Figura 1). A identificação das funções ou processos aos quais tais genes estão associados, feita por meio do programa FATIGO, mostrou que os genes são principalmente relacionados a processos metabólicos, organização de componentes celulares, comunicação celular, resposta a estresse, ciclo e morte celular, entre outros. Assim, na busca do entendimento dos mecanismos biológicos ativos em cada grau tumoral selecionamos 16 desses genes para serem mais detalhadamente descritos: *CRADD*, *NEDD4L*, *ADIPOR1*, *HTRA2*, *CALU*, *INPP4B*, *S100P*, *TBXAS*, *GSTP1*, *CHAF1B*, *CHEK1*, *CCT4 ANLN*, *SMAD4*, *ABCA7* e *SUMO1*.

Para o segundo agrupamento hierárquico, isto é, aquele que representa as respostas da linhagem celular RT4 (grau 1) frente aos diferentes tratamentos, com FDR de 4,787% e delta de 0,280, observou-se expressão diferenciada de 486 genes. A análise da função gênica mostrou que estes estavam principalmente associados a processos metabólicos, comunicação celular, organização de componentes celulares, resposta a estresses químicos, ciclo celular, entre outros. Da mesma forma descrita anteriormente, foram selecionados 11 genes (*ETNK1*, *NACA*, *GPR68*, *RUVBL2*, *BLZF1*, *CALU*, *AXIN2*, *ANAPC7*, *MCTS1*, *CDK6* e *GSTM3*) para serem discutidos mais detalhadamente na tentativa de entender os mecanismos biológicos relacionados às respostas celulares a cada tratamento. Pôde-se observar, também, que o perfil de expressão gênica após o tratamento combinado (cisplatina + gencitabina) foi o que apresentou maiores diferenças quando comparado ao controle (Figura 2).

Para o terceiro agrupamento hierárquico, aquele referente ao tratamento das células da linhagem 5637 (grau 2), com FDR de 4,859% e delta de 0,299, foram detectados 475 genes significativos. Segundo o Programa FATIGO, tais genes estão principalmente associados a processos metabólicos, de desenvolvimento, comunicação e ciclo celular, entre outros, e destes 13 (*NEDD8*, *HTR6*, *PCDHB14*, *RPL7*, *CLSPN*, *CCT7*, *STOML2*, *RGS8*, *MAST2*, *GOLGA2*, *DCRLRE1C*, *SLCA71* e *SYNPO*) foram inicialmente selecionados para serem detalhados. De maneira similar ao ocorrido para as células RT4, o perfil de expressão gênica apresentou maiores diferenças após o tratamento combinado, quando comparado ao controle (Figura 3).

Por fim, o quarto agrupamento hierárquico, que representa os dados obtidos do tratamento das células T24 (grau 3), com FDR de 0,369 e delta de 0,356, resultou na expressão gênica diferenciada de 558 genes. Novamente, tais genes estavam especialmente relacionados a processos metabólicos, de comunicação e ciclo celular, organização de componentes celulares, resposta a estresse, entre outros. Para este agrupamento 15 genes (*ANAPC2*, *STAG1*, *CALU*, *LIMK2*, *ETNK1*, *SEMA4A*, *RGS6*, *XRCC6*, *LIG4*, *SMAD4*, *DGK*, *PINI*, *GABRB3*, *POGK* e *NEK8*) foram selecionados para serem discutidos mais detalhadamente, na tentativa de entender os mecanismos biológicos envolvidos nas respostas a cada tratamento. O tratamento com a gencitabina apresentou perfil de expressão gênica semelhante ao do controle (Figura 4).

A Tabela 1 apresenta a localização e os *q-value* de cada gene que foi selecionado para ser mais detalhadamente analisado.

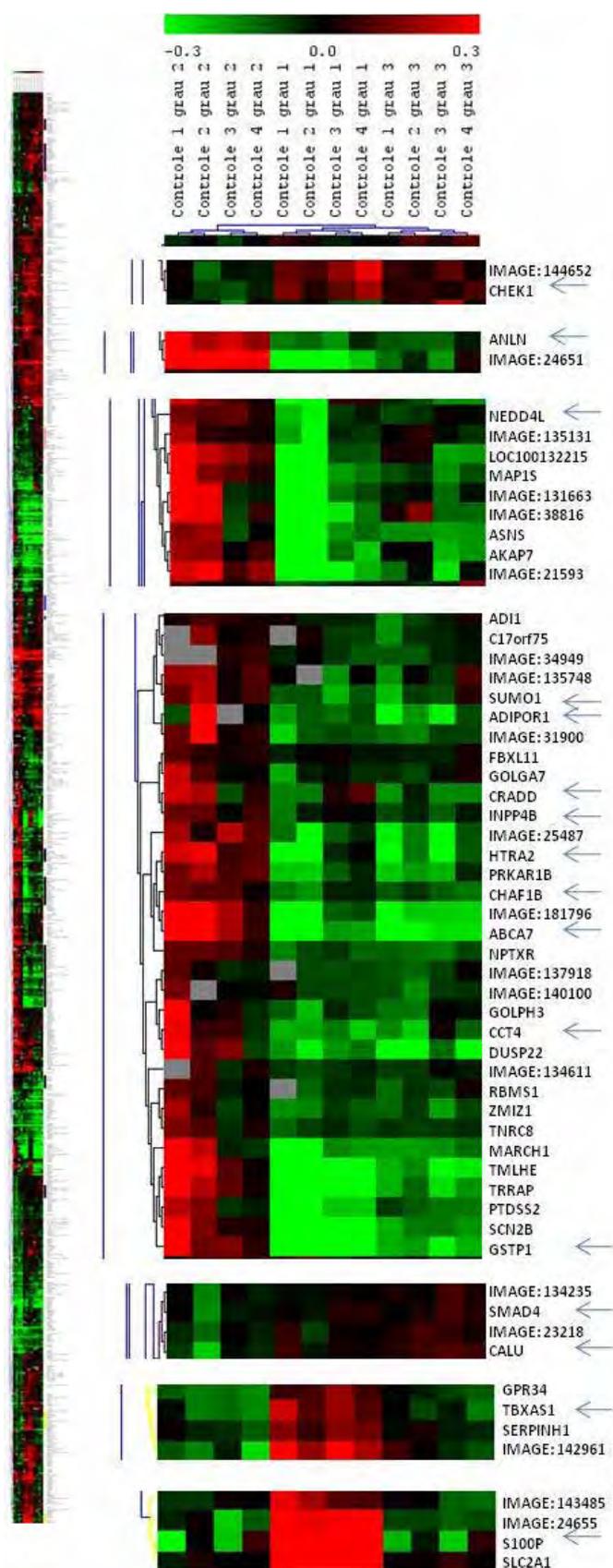


Figura 1 – Agrupamentos e subagrupamentos hierárquicos das linhagens RT4 (grau 1), 5637 (grau 2) e T24 (grau 3) de CCT de bexiga. Vermelho, indica indução da expressão gênica; verde, repressão; preto, sem modulação; cinza, dados perdidos. ← indica os genes que foram destacados para discussão.

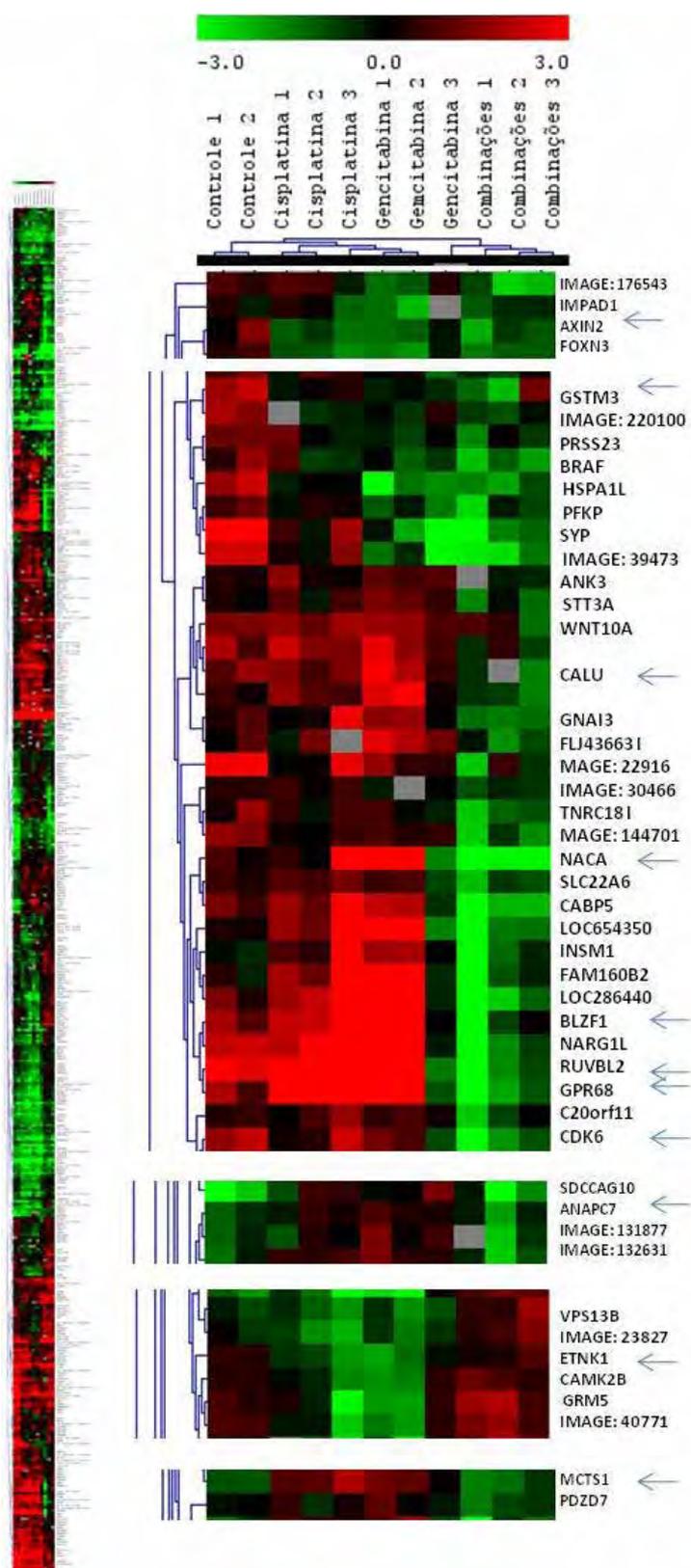


Figura 2 – Agrupamentos e subagrupamentos hierárquicos da linhagem RT4 (grau 1). Vermelho, indica indução; verde, repressão; preto, sem modulação; cinza, dados perdidos. ← indica os genes que foram destacados para discussão.

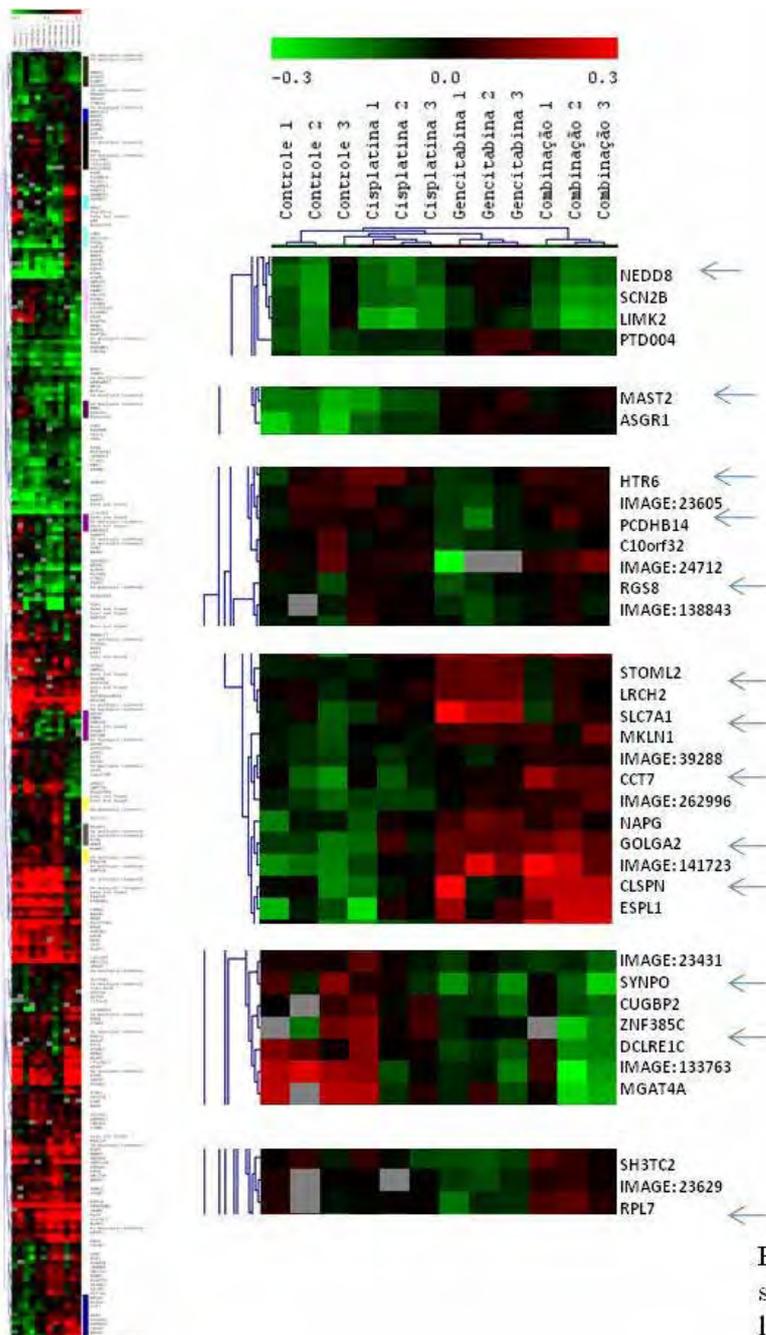


Figura 3 – Agrupamentos e subagrupamentos hierárquicos da linhagem 5637 (grau 2). Vermelho, indica indução; verde, repressão; preto, sem modulação; cinza, dados perdidos. ← indica os genes que foram destacados para discussão.

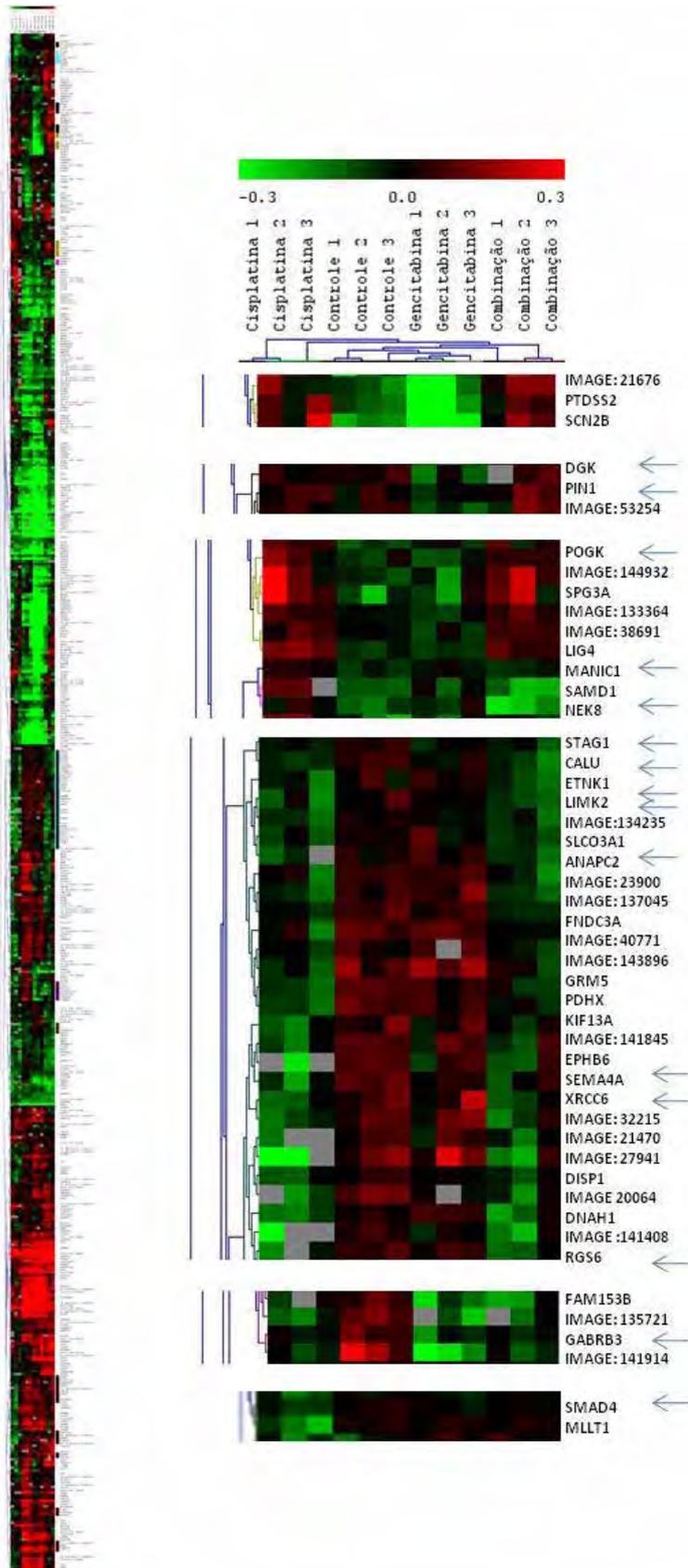


Figura 4 – Agrupamentos e subagrupamentos hierárquicos da linhagem T24 (grau 3). Vermelho, indica indução; verde, repressão; preto, sem modulação; cinza, dados perdidos. ← indica os genes que foram destacados para discussão.

Tabela 1 – Genes modulados que foram destacados dos 4 agrupamentos hierárquicos.

Gene	CloneID	Símbolo	Cromossomo	Citobanda	Score esperado (dExp)	Score observado (d)	q-value (%)	Agrupamento hierárquico
<i>SMAD family member 4</i>	IMAGE: 40768	<i>SMAD4</i>			0.58999485	0.83045334	0.29777327	1
<i>CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain</i>	IMAGE: 24032	<i>CRADD</i>	12	12q21.33-q23.1	0.18468015	1.087.869	0.29777327	1
<i>Adiponectin receptor 1</i>	IMAGE: 138982	<i>ADIPOR1</i>	1	1p36.13-q41	1.167.853	1.148.942	0.07807517	1
<i>Catumenin</i>	IMAGE: 143860	<i>CALU</i>	7	7q32	0.46737802	1.239.465	0.051551376	1
<i>Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa</i>	IMAGE: 165857	<i>INPP4B</i>	4	4q31.21	0.946623	1.250.204	0.051731624	1
<i>SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)</i>	IMAGE: 49768	<i>SUMO1</i>	2	2q33	0.70912695	1.519.735	0.0161344	1
<i>Chaperonin containing TCPI, subunit 4 (delta)</i>	IMAGE: 139688	<i>CCT4</i>	2	2p15	0.38458493	1.543.134	0.017324641	1

<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4like</i>	IMAGE: 24477	<i>NEDD4L</i>	18	18q21	0.6280862	1.610.874	0.0	1
<i>CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)</i>	IMAGE: 143919	<i>CHEK1</i>			0.61231035	1.687.584	0.0	1
<i>HtrA serine peptidase 2</i>	IMAGE: 24797	<i>HTRA2</i>	2	2p12	0.72683525	1.792.753	0.0	1
<i>Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)</i>	IMAGE: 35051	<i>CHAF1B</i>	21	21q22.13	0.4959979	1.856.436	0.0	1
<i>Thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)</i>	IMAGE: 143443	<i>TBXAS1</i>	7	7q34-q35	0.39550394	2.081.456	0.0	1
<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7</i>	IMAGE: 182933	<i>ABCA7</i>	19	19p13.3	0.25553852	2.332.722	0.0	1
<i>Anillin, actin binding protein</i>	IMAGE: 28051	<i>ANLN</i>	7	7p15-p14	0.5749327	3.353.407	0.0	1
<i>Glutathione S-transferase pi</i>	IMAGE: 136235	<i>GSTP1</i>	11	11q13	0.2231638	4.268.312	0.0	1
<i>S100 calcium binding protein P</i>	IMAGE: 135221	<i>S100P</i>	4	4p16	0.45618376	4.777.695	0.0	

<i>Anaphase promoting complex subunit 7</i>	IMAGE: 131110	ANAPC7	12	12q24.11	0.10152334	0.570547	2.308.564	2
<i>Ethanolamine kinase I</i>	IMAGE: 143513	ETNK1	12	12p12.1	0.33270106	0.6149407	1.952.417	2
<i>Axin 2 (conductin, axil)</i>	IMAGE: 135887	AXIN2	17	17q23-q24	0.11853664	0.628362	1.952.417	2
<i>Glutathione S-transferase M3 (brain)</i>	IMAGE: 137940	GSTM3	1	1p13.3	0.22351928	0.67988163	1.325.738	2
<i>Calumenin</i>	IMAGE: 144881	CALU	7	7q32	0.59533384	0.8071388	0.73435503	2
<i>Malignant T cell amplified sequence 1</i>	IMAGE: 142586	MCTS1	X	Xq22-q24	0.54066663	0.8181696	0.73435503	2
<i>Basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)</i>	IMAGE: 23012	BLZF1	1	1q24	0.5510001	0.88563484	0.4519108	2
<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	IMAGE: 231497	CDK6	7	7q21-q22	0.31047043	0.97415847	0.3749898	2
<i>RuvB-like 2 (E. coli)</i>	IMAGE: 22267	RUVBL2	19	19q13.3	0.42579043	0.9777575	0.38314176	2
<i>Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit</i>	IMAGE: 143833	NACA	12	12q23-q24.1	0.30691403	0.9903638	0.38314176	2
<i>G protein-coupled receptor 68</i>	IMAGE: 22652	GPR68	14	14q31	0.42472485	11.014.086	0.0	2

<i>Regulator of G-protein signaling 8</i>	IMAGE: 50030	<i>RGS8</i>	1	1q25	0.50402325	0.41575062	4.859.311	3
<i>PCDHBI4</i>	IMAGE: 35127	<i>PCDHBI4</i>	5	5q31	0.39474306	0.47176063	3.217.622	3
<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor6</i>	IMAGE: 31955	<i>HTR6</i>	1	1p36-p35	0.30338696	0.56182283	2.355.052	3
<i>NEED8</i>	IMAGE: 40776	<i>NEED8</i>	14	14q12	0.34481657	0.6117704	1.509.488	3
<i>DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)</i>	IMAGE: 1743667	<i>DCLRE1C</i>	10	10p13	0.6758676	0.65719837	1.509.488	3
<i>Synaptopodin</i>	IMAGE: 38156	<i>SYNPO</i>	5	5q33.1	0.76082	0.6729427	1.509.488	3
<i>RPL7</i>	IMAGE: 133647	<i>RPL7</i>	8	8q21.11	0.40653503	0.74605906	1.509.488	3
<i>Claspin homolog (Xenopus laevis)</i>	IMAGE: 53147	<i>CLSPN</i>	1	1p34.2	0.04680801	0.80641127	0.54573804	3
<i>Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)</i>	IMAGE: 264885	<i>CCT7</i>	2	2p13.2	0.4314264	0.8382401	0.54573804	3
<i>Stomatin (EPB72)-like 2</i>	IMAGE: 35374	<i>STOML2</i>	9	9p13.1	0.3352824	0.80554056	0.54573804	3
<i>TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 2 (E. coli)</i>	IMAGE: 24922	<i>GOLGA2</i>	9	9q34.11	0.70595396	0.9913396	0.5067568	3

<i>Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1</i>	IMAGE: 134712	<i>SLC7A1</i>	13	13q12-q14	0.16335116	1.096.918	0.0	3
<i>Microtubule associated serine/threonine kinase 2</i>	IMAGE: 40173	<i>MAST2</i>	1	1p34.1	0.39816353	1.088.416	0.0	3
<i>Peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1</i>	IMAGE: 171663	<i>PIN1</i>	19	19p13	1.198.043	0.7287449	0.14179975	4
<i>Stromal antigen 1</i>	IMAGE: 137245	<i>STAG1</i>	3	3q22.3	0.6154017	0.73040915	0.14179975	4
<i>SMAD family member 4</i>	IMAGE: 40768	<i>SMAD4</i>			0.5390594	0.80264163	0.11658057	4
<i>LIM domain kinase 2</i>	IMAGE: 140191	<i>LIMK2</i>	22	22q12.2	0.49248365	0.82683384	0.11658057	4
<i>Ethanolamine kinase 1</i>	IMAGE: 143513	<i>ETNK1</i>	12	12p12.1	0.45663702	0.8306008	0.11658057	4
<i>Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A</i>	IMAGE: 147841	<i>SEMA4A</i>	1	1q22	0.20957991	0.8321435	0.11658057	4

<i>Diacylglycerol kinase, alpha 80kDa</i>	IMAGE: 142621	<i>DGK</i>	12	12q13.3	0.8172464	0.8692771	0.11658057	4
<i>Regulator of G-protein signaling 6</i>	IMAGE: 24176	<i>RGS6</i>	14	14q24.3	0.2217296	0.91786695	0.11658057	4
<i>Pogo transposable element with KRAB domain</i>	IMAGE: 25151	<i>POGK</i>	1	1q24.1	0.12816845	0.9184519	0.11658057	4
<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa)</i>	IMAGE: 24507	<i>XRCC6</i>	22	22q13.2-q13.31	0.32688582	0.93771297	0.11658057	4
<i>GABRB3</i>	IMAGE: 32381	<i>GABRB3</i>	15	15q11.2-q12	0.58285767	1.031.120	0.11658057	4
<i>Anaphase promoting complex subunit 2</i>	IMAGE: 136462	<i>ANAPC2</i>	9	9q34.3	0.36078292	1.111.630	0.11658057	4
<i>Calumenin</i>	IMAGE: 143860	<i>CALU</i>	7	7q32	0.41215387	1.116.424	0.025314746	4
<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 8</i>	IMAGE: 139546	<i>NEX8</i>	17	17q11.1	0.19428988	1.461.656	0.0	4

<i>Ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>	IMAGE: 39274	<i>LIG4</i>	13	13q33-q34	0.39198142	2.127.819	0.0	4
--	--------------	-------------	----	-----------	------------	-----------	-----	---

DISCUSSÃO

Agrupamento hierárquico de expressão gênica considerando as diferentes linhagens celulares (sem tratamento)

A linhagem de grau 1 (RT4, tumor superficial) apresentou padrão de expressão gênica semelhante ao da linhagem de grau 3 (T24, tumor invasivo). Histologicamente, a maioria dos tumores invasivos não tem precursor papilar e são lesões invasivas sólidas. Entretanto, cerca de 70% dos pacientes com tumores superficiais apresentam recorrências e, ainda, em aproximadamente 10% a 20%, há progressão para invasão muscular (Smith, 1999). Dessa maneira, a detecção da expressão alterada de genes em tumores superficiais que indiquem possível progressão tumoral pode ser de importância terapêutica.

Nossos dados mostraram a repressão de genes envolvidos em mecanismos apoptóticos, especialmente nas linhagens de graus 1 (RT4) e 3 (T24), em relação à linhagem 5637. Este fato poderia indicar o bloqueio, ou redução da morte celular programada, o que contribuiria para o acúmulo de células em proliferação. O gene *CRADD* (*casp2 and ripk1 domain-containing adaptor with death domain*) está relacionado a processos apoptóticos, mais precisamente à ativação de caspases. A superexpressão deste gene indica que a célula está direcionada à morte por apoptose (Ahmad et al., 1997). Por outro lado, o gene *NEDD4L*, que codifica a proteína *ubiquitina ligase* e que tem como alvo os canais de sódio, tem papel importante em diversos mecanismos da função celular, incluindo a ubiquitinação de proteínas, regulação da transcrição e apoptose (Plant et al., 2000). Transcritos do gene *NEDD4L* já foram encontrados, por exemplo, em câncer de próstata (Qi et al., 2003).

É conhecido que o gene da *adiponectina*, por meio de receptores específicos (ADIPO R1, por exemplo), regula diversos mecanismos de sinalização, entre os quais a AMPkinase (Yamauchi et al., 2003), JAK/STAT3 (Miyazaki et al., 2005) e MAPKinase (p38 MAPK, ERK, JNK) (Yamauchi et al., 2003). Alguns autores mostraram que em células de câncer de mama MCF-7, a adiponectina estimula o mecanismo AMPkinase, o qual está associado ao controle negativo de progressão do ciclo celular (Luo et al., 2005). Além disso, em vários tipos celulares, a ativação da AMPkinase foi descrita como indutora de resposta pró-apoptótica (Dagon et al., 2006). Da mesma forma, a inibição da fosforilação de MAPkinase pelo inibidor específico PD98059, foi responsável por estimular a expressão dos genes *TP53* e *Bax* em células MCF-7 (Ostrakhovitch et al., 2005). O gene *HTRA2*, codifica uma protease serina mitocondrial, que está na lista das proteínas pró-apoptóticas, como a Smac (proteína

que promove ativação de caspases) e endonuclease G, que são liberadas da mitocôndria durante apoptose, reforçando a importância desta organela no mecanismo de morte de células eucarióticas. Em adição, foi descrito que o gene *HTRA2* pode atuar como inibidor de IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) no mecanismo apoptótico dependente de caspase (Savopoulos et al., 2000).

O gene *ABCA7*, por sua vez, reprimido nas linhagens RT4 e T24 quando comparado à 5637, está relacionado à fosforilação de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), que é necessária para a fagocitose eficiente de células apoptóticas (Osada et al., 2006). Alguns autores mostram, ainda, que a ativação de ERK para fagocitose também está relacionada à reorganização da actina (Kutsuna et al., 2004), à regulação de adesão focal (Orr et al., 2002) e à migração celular (Stahle et al., 2003). Com relação ao gene *SUMO1*, este codifica proteínas que são relacionadas à ubiquitinação e envolvidas na regulação da transcrição gênica, ciclo celular, reparo do DNA e localização protéica (Hecker et al., 2006).

É sabido que a indução de genes relacionados à proliferação celular pode, também, contribuir para a progressão tumoral. O gene *CALU*, por exemplo, apresentou-se expresso nas linhagens RT4 (grau 1) e T24 (grau 3), quando comparado à 5637. A função exata desse gene no processo tumoral ainda permanece desconhecida. Entretanto, sua superexpressão sugere a ocorrência de transmissão de informação celular de forma acelerada. Desta forma, a expressão alterada de *CALU* poderia ativar a cascata de sinalização intracelular resultando em proliferação celular como as observadas em tumores (Ding et al., 2004). O gene *INPP4B*, por sua vez, mostrou-se reprimido nas linhagens de grau 1 e 3. Este gene, embora não relacionado à resposta a danos no DNA, é associado à inibição da proliferação celular em fibroblastos, sugerindo que sua proteína tem papel importante no controle do ciclo celular (Vyas et al., 2000).

A compreensão dos fatores genéticos que regulam o balanço entre apoptose e sobrevivência celular é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos que podem levar ao aumento da agressividade tumoral. Como foi observado, genes que levam ao bloqueio da apoptose, ou ao estímulo da proliferação celular, apresentaram-se igualmente expressos nas linhagens de graus 1 e 3, indicando possíveis mecanismos relacionados à progressão tumoral. Fato interessante, foi a superexpressão de genes relacionados à progressão tumoral (*S100P* e *TBXAS*), cuja indução só foi detectada na linhagem de grau 1. Sabe-se que gene *S100P* tem sua expressão aumentada durante a progressão de câncer

pancreático, de mama, cólon, próstata e pulmão. Em linhagens de células de câncer de mama, a expressão aumentada desse gene foi associada à imortalização celular (Guerreiro et al., 2000); em linhagens de células de câncer de cólon, seus níveis de expressão foram correlacionados com a resistência à quimioterapia (Bertram et al., 1998); em câncer de pulmão, a expressão de *S100P* correlacionou-se à diminuição da sobrevivência do paciente (Beer et al., 2002). Alguns pesquisadores observaram, ainda, que linhagens celulares de câncer pancreático que secretam a proteína S100P tinham proliferação, sobrevivência, motilidade e invasividade estimuladas em relação às células que não a secretam (Arumugam et al., 2005). O gene *TBXAS*, que cataliza a síntese de tromboxane A2 (TXA2), foi também encontrado superexpresso em tumores invasivos de bexiga. O tratamento de linhagem celular de câncer de bexiga com inibidores de *TBXAS* foi capaz de reduzir o crescimento, migração e capacidade de invasão das células (Moussa et al., 2005). Desta forma, a superexpressão de *TBXAS* parece estar associada a alto grau, estágio avançado, envolvimento de linfonodos e pior prognóstico para pacientes com câncer de bexiga.

Apesar das células de tumor de grau 2 (5637) terem apresentado perfil de expressão gênica diferente das outras duas linhagens, outros genes envolvidos nos mecanismos de apoptose e proliferação celular poderiam, também, justificar o potencial agressivo desses tumores. Fato que deve ser ressaltado, é que o balanço entre proliferação e morte celular, contribuindo para a progressão tumoral, envolve inúmeros mecanismos celulares, nos quais muitas vezes a sinalização para sobrevivência celular supera os sinais para apoptose. Assim, alguns genes que favorecem direta ou indiretamente a proliferação celular merecem destaque. O gene *GSTP1*, por exemplo, induzido na linhagem de grau 2, tem se apresentado hiperexpresso em diferentes tecidos epiteliais humanos e em tumores, incluindo o carcinoma de bexiga (Lafuente et al., 1990; Beckett et al., 1993). Alguns autores sugerem que o *GSTP1* bloqueia a apoptose induzida pelo arsênio em células de linfoma. O gene *CHAF1B*, por sua vez, é essencial à viabilidade de células proliferativas humanas, e sua repressão pode levar ao acúmulo de danos no DNA e indução de morte celular programada. Este gene poderia levar a perda da estrutura da cromatina, ativação de *checkpoint*, parada na fase S e morte rápida (Nabatiyan & Krude, 2004). Em nossos experimentos, o gene *CHAF1B* estava induzido na linhagem de grau 2. Por outro lado, o gene *CHEK1* (*checkpoint kinase 1*), essencial para saída da fase S por minimizar a ocorrência de eventos associados à replicação aberrante e *checkpoints* G2/M, se mostrou reprimido nessa linhagem. É sabido, que a inibição de *CHEK1* favorece o acúmulo de quebras de DNA, aumentando a sensibilidade das células tumorais aos

agentes antitumorais (Kortmansky et al. 2005). Além disso, tem sido demonstrado que a inibição de *CHEK1* pode potencializar o efeito de agentes que causam danos no DNA de células de câncer *TP53* deficientes (Tenzer et al., 2003). Durante a progressão do ciclo celular normal, a atividade basal do *CHEK1* auxilia na manutenção da estabilidade genômica por prevenir mitose anormal, o que ocorre por meio da supressão de atividade *Cdc25A/Cdc2* (Sorensen et al., 2003). Além desses, outro gene que se mostrou super expresso nas células 5637 foi o *CCT4*, pertencente à família das chaperoninas e conhecido como *chaperonin containing t-complex polypeptide*, e que governa a biogênese da ciclina E (Hartl, F. U. 1996). Deve ser destacado que em células de mamíferos, a ciclina E é um regulador positivo da transição G1/S no ciclo celular (Morgan et al., 1995).

A expressão diferenciada de genes associados a progressão tumoral também foi observada na linhagem celular 5637 (grau 2). O gene *ANLN* (anilina) produz uma proteína de ligação à actina, que é um componente importante no sistema de filamentos durante a citocinese (Oegema et al., 2000). De forma similar à observada em nossos experimentos, alguns autores descreveram a superexpressão desse gene em diversos tumores, relacionando os achados à progressão tumoral. Por outro lado, o gene *SMAD4*, um transdutor chave de sinalização da superfamília do fator de crescimento-h (TGF-h) e que regula a proliferação e diferenciação celular e apoptose (Derynck et al., 2001), apresentou-se reprimido na linhagem 5637. Alguns estudos têm mostrado que a inativação do gene *SMAD4* pode estar relacionada à transformação maligna de adenomas gastrointestinais (Takaku et al., 1998), e que há redução nos níveis de RNAm durante a progressão tumoral (Mikami et al., 2001).

Diante do apresentado, os resultados do agrupamento hierárquico para as diferentes linhagens celulares apontam para expressão alterada de genes relacionados, principalmente, à apoptose e à proliferação celular. Embora o RNAm não seja o último produto gênico, a transcrição é o primeiro passo na regulação gênica, auxiliando na compreensão das redes regulatórias.

Agrupamento hierárquico de expressão gênica nas linhagens celulares após os diferentes tratamentos

Na linhagem RT4, vários genes relacionados, direta ou indiretamente, ao processo apoptótico foram modulados após os diferentes tratamentos. O gene *ETNK1*, cuja superexpressão tem sido associada à supressão de morte celular apoptótica (Lykidis et al., 2001), apresentou-se reprimido nos tratamentos com a cisplatina e com a gencitabina, isoladamente.

Outros genes, como o *NACA*, *GPR68*, *RUVBL2*, *BLZF1* e o *CALU* apresentaram-se reprimidos após o tratamento combinado das drogas. Estudos anteriores revelaram que o gene *NACA* funciona como um co-ativador transcricional em osteoblastos, por meio da interação com a c-jun, um membro da família de proteínas ativadoras-1 (AP-1) (Moreau et al., 1998). Mais recentemente, foi sugerido que o *NACA* participa, também, da regulação do complexo FADD (*Fas-associated death domain*) (Stilo et al., 2003). Dessa forma, acredita-se que esse gene tem papel importante na proliferação celular e apoptose, dependendo do contexto celular e do estímulo. O gene *GPR68*, por sua vez, pertence à subfamília dos receptores ligados à proteína G. Há estudo que sugere o envolvimento deste gene em processos como apoptose, inibição de formação de fibras do fuso e bloqueio parcial da progressão da mitose, e supressão da inibição por contato (Radu et al., 2005). Outro gene que apresentou expressão diferenciada nas células RT4 foi o *RUVBL2*, o qual parece desempenhar função importante na resposta ao tratamento com a radiação ionizante. Sabe-se que mudanças na expressão desse gene resultam em alterações no ciclo celular (diminuição do tempo da parada em G2), redução da resposta apoptótica e indução de reparo do DNA (Cho et al., 2001). Da mesma forma, foi observada expressão aumentada do gene *BLZF1*, possível cofator de transcrição que controla a expressão de c-jun e c-fos (Tong et al., 1999), atua na via de sinalização Rho GTPase/JNK-c-jun, provavelmente estando relacionado com a inibição de vias apoptóticas e ativação de mecanismo de reparo do DNA. O gene *CALU*, já discutido anteriormente, quando super-expresso ativa a cascata de sinalização intracelular resultando em proliferação celular semelhante à observada em tumores (Ding et al., 2004).

Interessantemente, observamos que o gene *AXIN2*, regulador negativo da sinalização Wnt/-catenin (via envolvida em muitos tipos de cânceres) e que atua como supressor tumoral (Jho et al. 2002; Leung et al. 2002), mostrou-se reprimido na linhagem RT4 em todos os tratamentos. Assim, consideramos que este gene também merecia destaque, já que pode ter papel relevante na recorrência tumoral. Por outro lado, os genes *ANAPC7* e *MCTS1* apresentaram-se induzidos após os tratamentos individualizados com a cisplatina ou com a gencitabina. O gene *ANAPC7* (*anaphase-promoting complex*) produz uma ubiquitina ligase que tem importantes funções na mitose, meiose, fase G1 do ciclo celular e em células diferenciadas pós-mitose (Harper et al., 2002); o gene *MCTS-1*, por sua vez, está associado à redução do tempo de duplicação celular por diminuir o período de transição G1/S, levando ao fenótipo de transformação (Dierov et al., 1999). Dessa maneira, a expressão do *MCTS-1* resulta em forte sinal proliferativo e está associada à desregulação do *checkpoint* G1/S. Este

gene e o *ANAPC7* podem, também, estar relacionados à recorrência tumoral, uma vez que a expressão induz sinais de proliferação.

Outros genes que mereceram destaques foram o *CDK6*, que codifica uma proteína ativada por ligação a ciclinas D e que se mostrou reprimido após o tratamento combinado cisplatina/gencitabina, e o *GSTM3*, que se apresentou reprimido em todos os tratamentos. Estudos recentes mostram que a super-expressão de *CDK6* bloqueia a diferenciação em células leucêmicas e em osteoblastos e afeta a proliferação e diferenciação em meduloblastoma e outros tumores. Além disso, foi relatado que a expressão aumentada deste gene pode contribuir para a progressão do câncer de próstata (Lim et al., 2005). Com relação ao *GSTM3*, normalmente expresso em testículo, cérebro, pulmão, linfócitos e em vários tipos de tumores, foi descrito que os genes da família da glutationa S-transferase, protegem as células contra insultos tóxicos por catalizar adições nucleofílicas, ou reações de substituição entre glutationa e compostos eletrofílicos reativos (Liu et al., 2005).

Na linhagem 5637, foi observado que o tratamento com a gencitabina levou à modulação de diversos genes. O gene *NEDD8*, que está envolvido na regulação de receptores nucleares (Antenos et al., 2002) e nos mecanismos de ubiquitinação protéica (Wu et al., 2000), mostrou-se induzido após o tratamento. Alguns autores sugerem que alterações nos níveis de expressão deste gene podem levar tumores a adquirirem resistência ao estrógeno (Fan et al., 2003), e a perda de expressão já foi observada durante a transformação maligna do câncer de próstata (Meehan et al., 2002). O gene *HTR6*, por sua vez, apresentou-se reprimido após o tratamento com a gencitabina. Este gene está associado à ativação da adenilato ciclase, e pode contribuir para a progressão tumoral por estimular secreção de hormônios e outros fatores de crescimento (Raymond et al., 2001).

O tratamento combinado cisplatina/gencitabina foi o que induziu maiores alterações na expressão gênica nas células 5637. Foi observada especialmente a indução dos genes *PCDHB14*, *RPL7*, *CLSPN*, *CCT7*, *RGS8*, *MAST2* e *GOLGA2*, cujas principais funções são resumidamente descritas na sequência. O gene *PCDHB14*, pertencente à superfamília das caderinas (moléculas de adesão celular cálcio-dependentes), tem sido relacionado à morfogênese tecidual (Gumbiner, 2000). Dentre os genes responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas a componentes ribossomais, estava o *RPL7*. No crescimento celular normal, as proteínas ribossomais são sintetizadas em coordenação com o RNA ribossomal (Mager et al., 1988). Estudos recentes fornecem evidências de que as proteínas ribossomais podem também atuar durante os processos celulares de replicação, transcrição, processamento

de RNA, reparo de DNA e inflamação (Yamamoto et al., 2000). Há estudo mostrando que o gene *RPL7* é expresso em glândulas secretórias de mucosa normal colon-retal e em células de carcinoma (Kasai et al., 2003). Em particular, a hiper regulação de transcritos para diversas proteínas ribossomais tem sido observada em diversas neoplasias, incluindo o câncer de esôfago (Wang et al. 2001).

A família do gene *CLSPN*, por sua vez, expressa proteínas reguladoras do ciclo celular que se associam à cromatina durante a fase S (Lee et al., 2003). No caso de danos no DNA, essas proteínas são fosforiladas e interagem com a proteína Chk1. Esta interação é necessária para ativação do mecanismo Chk1 dependente de ATR (Kumagai et al., 2004). Há estudo mostrando, por exemplo, que a ausência de expressão desse gene em células na fase G1 previne a entrada precoce na fase S (Chen & Sanchez, 2004). Da mesma maneira, o gene *CCT7*, relacionado à classe das chaperoninas, foi descrito como tendo papel essencial na maturação da ciclina E em leveduras. A ciclina E tem sido associada ao controle da transição G1/S do ciclo celular. Sob condições em que a função da proteína CCT é afetada, a ciclina E não se acumula (Kumagai et al., 2004). Outra família de genes, a qual pertence o *RGS8*, está associada a proteínas RGS, que regulam negativamente a sinalização da proteína G heterodímera. Essas proteínas citoplasmáticas estão envolvidas na iniciação e regulação de diferentes vias de sinalização intracelular que controlam uma variedade de respostas celulares, tais como proliferação, migração e diferenciação (Woods et al., 2002).

O gene *GOLGA 2*, que também se mostrou diferentemente expresso na linhagem 5637 após os tratamentos com os antineoplásicos, é um dos responsáveis pela formação do complexo de Golgi que, como é sabido, está relacionado ao mecanismo de secreção celular (Fritzler et al., 1993). Genes relacionados à resposta imune também foram modulados. Merece destaque a expressão do gene *MAST2*, cujo produto é uma proteína regulatória que leva à síntese de IL-12 (Okasaki et al., 2002), que já foi encontrada induzida em linhagem de células de carcinoma epitelial A431 (Nagarajan et al., 2002). Os genes *DCRLRE1C* e *SYNPO* que se apresentaram reprimidos no tratamento combinado das drogas e no tratamento apenas com a gencitabina, codificam, respectivamente, uma proteína que é substrato para atividade de kinases e uma proteína associada à actina que tem sido identificada como novo regulador de sinalização RhoA (GTPases). Deficiências no gene *DCRLRE1C*, causadas, por exemplo, pela exposição à radiação ionizante, levam à defeitos no *checkpoint* G2/M do ciclo celular (Darroudi et al., 2007). Já o gene *SYNPO* tem papel essencial na integridade do citoesqueleto, e o sua repressão pode levar à formação de fibras aberrantes do fuso mitótico (Asanuma et al., 2005).

Outro gene que mereceu destaque e, que se apresentou induzido tanto no tratamento com a gencitabina, como no tratamento combinado, foi o gene *STOML2*, que também se mostrou superexpresso em células tumorais e que está envolvido na regulação do crescimento e adesão celular). A detecção precoce em lesões pré-malignas indicam que este gene pode servir como marcador para detecção de câncer de pulmão, câncer de laringe, adenocarcinoma endometrial (Zhang et al., 2006). O gene *SLC7A1*, que apresentou expressão semelhante em todos tratamentos, é responsável pelo transporte de aminoácido de alta afinidade, facilitando, por exemplo, o transporte de arginina e lisina em mamíferos. A expressão de *SLC7A1* pode ser modulada por uma variedade de estímulos incluindo proliferação celular, fatores de crescimento, citocinas, certos hormônios, nutrientes e microRNAs. Em modelos experimentais, a expressão alterada desse gene resulta em mudanças relevantes na produção de NO e funções endoteliais. (Yang et al., 2007)

Na linhagem T24, o maior agrupamento hierárquico observado, mostra que genes importantes (*ANAPC2*, *STAG1*, *CALU*, *LIMK2*, *ETNK1*, *SEMA4A* e *RGS6*) foram reprimidos após os tratamentos com cisplatina e com a combinação cisplatina/gencitabina. O gene *ANAPC2* (*anaphase-promoting complex*) codifica uma ubiquitina ligase com funções importantes na mitose, meiose, fase G1 do ciclo celular e em células diferenciadas pós-mitose. Seu papel é bem entendido na mitose, já que este gene é essencial na separação das cromátides irmãs durante a anáfase e pela subsequente saída da mitose. O *ANAPC2* inicia tais eventos por ubiquitinação de ciclinas mitóticas, ativação de subunidades de kinase-1 dependente de ciclinas (cdk1) e pela ubiquitinação da securina, um inibidor de proteases que desfaz a ligação entre as cromátides irmãs por clivar os complexos de coesão (Harper et al., 2002). Da mesma maneira, o gene *STAG1*, também reprimido nesses tratamentos, está envolvido na coesão das cromátides irmãs durante a meiose e a mitose, evento chave na segregação cromossômica durante o ciclo celular (Sumara et al., 2000). Conforme discutido anteriormente, o gene *CALU* parece estar associado à transmissão acelerada da informação celular. Desta forma, sua expressão alterada poderia ativar a cascata de sinalização intracelular, resultando em aumento da proliferação como a já observada em células tumorais (Ding et al., 2004). Por outro lado, a repressão do gene *CALU*, como a observada na linhagem T24 tratada com cisplatina e com a combinação das drogas, poderia estar relacionada a mecanismos anti-proliferativos.

O gene *LIMK2* (*lim kinases 2*) tem seus produtos associados às vias reguladoras da dinâmica do citoesqueleto de células eucarióticas e é especificamente ativado pelo gene

ROCK (Sumi et al., 2001). Estudos recentes sugerem que o *LIMK2* induz a formação de fibras do fuso e adesão focal e de vesículas na membrana celular durante o processo apoptótico (Amano et al., 2001). Suyama et al. (2004) mostraram que a redução da proteína LIMK2 restringe as propriedades metastáticas das células sem afetar, no entanto, sua proliferação. Dessa maneira, os dados existentes na literatura sugerem que a via *RHO/ROCK/LIMK* pode ser considerada um alvo potencial para a terapia anti-metástase. Outro gene que consideramos importante ressaltar a expressão diferenciada (reprimida nas células T24 tratadas) é o *ETNK1*, cuja superexpressão tem sido relacionada à supressão da morte celular por apoptose (Lykidis et al., 2001) e, portanto, ao crescimento invasivo do câncer (Zafarana et al., 2002).

Genes que atuam direta ou indiretamente na resposta imunológica também se mostraram reprimidos na linhagem T24 após os tratamentos com a cisplatina e com a combinação cisplatina/gencitabina. O gene *SEMA4A*, pertencente à classe das semaforinas, além de ter papel importante na resposta imune, também participa de processos de organogênese, vascularização, angiogênese, apoptose neural e transformação neoplásica. O *SEMA4A* é preferencialmente expresso em células B e células dendríticas e está envolvido na ativação de células T (Kumanogoh & Kutani, 2003). Outra família de genes importantes é a representada pelas proteínas RGS que regulam negativamente a sinalização da proteína G heterodimérica. Essas proteínas citoplasmáticas estão envolvidas na iniciação e regulação de diferentes vias de sinalização intracelular que controlam uma variedade de respostas celulares, tais como proliferação, migração e diferenciação (Woods et al., 2002).

Os genes de reparo do DNA, *XRCC6* e *LIG 4*, foram também modulados pelo tratamento com a cisplatina e com a combinação cisplatina/gencitabina. É sabido que agentes exógenos (físicos e químicos), subprodutos do metabolismo oxidativo e perturbações na replicação do DNA induzem quebras de fita dupla. Essas quebras são reparadas por meio de mecanismos distintos como a recombinação homóloga e o NHEJ (*nonhomologous end joining*). O gene *XRCC6*, reprimido no tratamento com a cisplatina e com a combinação cisplatina/gencitabina, e o gene *LIG 4*, que codifica uma ligase que também atua sobre quebras de fita dupla, e que se apresentou induzido nos tratamentos com a cisplatina e combinações, parecem estar envolvidos nesses mecanismos (Riballo et al, 2001; Lieber et al., 2003). A indução da expressão do gene *POGK*, também foi observada nos tratamentos com cisplatina e combinado. *POGK* é um gene envolvido no mecanismo anti-apoptótico, mas a função específica da proteína codificada ainda não é conhecida (Greenhalf et al., 1999).

Portanto, nossos dados sugerem que os tratamentos com os agentes quimioterápicos afetaram a expressão de genes relacionados a diversos mecanismos celulares, alterando a resposta imunológica, a proliferação celular, o sistema de reparo do DNA e a estrutura e divisão celular. Fato que merece destaque é a repressão do gene *SMAD4* no tratamento somente com a cisplatina nas células T24. Como já discutido, a redução dos níveis do RNAm desse gene já foi observada durante a progressão tumoral (Mikami et al., 2001). Assim sendo, o gene *SMAD4* mereceu destaque por que pode estar envolvido nos mecanismos de resistência ou recorrência tumoral.

O tratamento com a gencitabina também modulou genes importantes na linhagem T24, como o *DGK* (*diacylglycerol kinase*) e o *PINI* que se mostraram reprimidos após o tratamento. O gene *DGK* tem atraído especial atenção devido a fortes evidências que indicam seu envolvimento na regulação de processos de transdução de sinais. A proteína DGK é abundante no citosol de linfócitos T, mas é também expressa em células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e oligodendrócitos. Estudo recente mostra que atividade de *DGK* é necessária para transição G1-S induzida por IL-2 em células T (Bacchiocchi et al., 2005). O gene *PINI*, por sua vez, está envolvido na regulação de muitos processos celulares, incluindo a proliferação e a diferenciação celular. Há evidências que sugerem que o *PINI* pode ter função na oncogênese e pode ser alvo potencial de novas drogas terapêuticas. Há estudo que mostra que a inibição do gene *PINI* em células de câncer pode levar à apoptose e/ou à supressão de fenótipos de transformação (Suizu et al., 2006). Em nossos experimentos, apesar de ter sido observada diminuição da sobrevivência celular, não foi observada apoptose. Pode-se supor que este gene estaria realmente relacionado à inibição da proliferação, mas por outros mecanismos.

Um dos genes que foi reprimido frente aos três tratamentos com os compostos antineoplásicos foi o *GABRB3*, que pertence à família de receptor GABA. De fato, esta família tem se mostrado superexpressa em tumores pancreáticos, sugerindo que o aumento transcricional destes genes é evento precoce no processo tumorigênico (Johnson & Haun, 2005). Outro gene que mereceu destaque e que também foi reprimido frente aos três tratamentos foi o *NEK8*, pertencente à família das *kinases nek*, e que está associado à estrutura do centróssomo, além de regular a dinâmica dos microtúbulos e progressão do ciclo celular para G2/M (Fry, 2002).

Finalizando, os genes que foram destacados são aqueles que, ao nosso ver, poderiam estar associados ao sucesso da terapia anti-tumoral. Os grupos de genes incluíram aqueles relacionados, principalmente, à apoptose, ao reparo de danos no DNA e a constituintes celulares. Nas três linhagens estudadas, o tratamento combinado cisplatina/gencitabina levou a grandes alterações no padrão de expressão gênica, especialmente sobre aqueles genes associados à inibição da proliferação celular, em relação às células não tratadas. Dessa forma, nossos resultados permitem sugerir que o tratamento combinado parece ter sido o mais efetivo, independentemente do grau do tumor, apesar de que alguns genes relacionados, por exemplo, a oncogênese e à progressão do tumoral foram inversamente modulados pelo tratamento.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD M., SRINIVASULA SM, WANG L, TALANIAN RV, LITWACK G, FERNANDES AT, ALNEMRI ES. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase 2, and FasL/tumor necrosis factor receptor interacting protein RIP. **Cancer Res**, 57:615-619, 1997.
- AMANO T, TANABE K, ETO T, NARUMIYA S, MIZUNO K. LIM-kinase2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. **Biochem J**, 354:149-159, 2001.
- AMUDSON SA, BITTNER M, CHEN Y, TRENT J, MELTZER P, FORNACE AJ. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. **Oncogene**, 18:3666-3672, 1999.
- ANTENOS M, CASPER RF, BROWN TJ. Interaction with NEDD8, a ubiquitin-like protein, enhances the transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. **J Biol Chem**, 277:44028-44034, 2002.
- ARUMUGAM T, SIMEONE DM, GOLEN K, LOGSDON CD. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival and invasion. **Clin Cancer Res**, 11: 5356-5364, 2005.
- ASANUMA K.. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. **J. Clin. Invest**, 115: 1188-1198, 2005.
- BACCIOCCHI R, BALDANZI G, CARBONARI D, CAPOMAGI C, COLOMBO E, VANBLITTERSWIJK WJ, GRAZIANI A, FAZIOLI F. Activation of diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase. **Blood**, 106: 2175-2182, 2005.
- BAITHUN SI, NAASE M, BLANES A, DIAZ-CANO SJ. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. **Virchows Arch**, 438:289-297, 2001
- BECKETT GJ, HAYES JD. Glutathione S-transferases: biomedical applications. **Adv Clin Chem**, 30: 281-380, 1993.
- BEER DG, KARDIA SL, HUANG CC. Gene expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med**, 8:816-824, 2002.
- BERMAN DM, WANG Y, LIU Z, DONG Q, BURKE L, LIOTTA LA, FISHER R, WU X. A functional polymorphism in RGS6 modulates the risk of bladder cancer. **Cancer Res**, 64: 6820-6826, 2004.
- BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PME, VAN DER NOORDA A. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **J Clin Microbiol**, 3:495-503, 1990.
- CHEN Y, SANCHEZ Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. **DNA Repair**, 3:1025-1032, 2004.
- CHESTER JD, HALL GD, FORSTER M et al. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer – current controversies and future directions. **Cancer Treatment Rev**, 30: 343-358, 2004.
- CHO SG, BHOUMIK A, BRODAY L, IVANOV V, ROSENSTEIN B, RONAI Z. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. **Mol Cell Biol**, 21:8398-413, 2001.
- CRUL M, VAN WAARDENBURG CAM, BOCXE S, VAN EIJDHOVEN MAJ, PLUIM D, BEIJNEN JH. DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin. **Biochem Pharmacol**, 65: 275-282, 2003.
- DAGON Y, AVRAHAM Y, BERRY EM. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, 340: 43-47, 2006.

- DARROUDI F, WIEGANT W, MEIJERS M, FRIDL AA, VAN DER BURG M, FOMINA J. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. **Mutat Res**, 3:111-124, 2007.
- DERYNCK R, AKHURST RJ, BALMAIN A. TGF-h signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, 29:117-129, 2001.
- DIEROV J, PROSNIAK M, GALLIA G, GARTENHAUS RB. Increased G1 cyclin/cdk activity in cells overexpressing the candidate oncogene, MCT-1. **J Cell Biochem**, 74:544-550, 1999.
- DING SJ, LI Y, SHAO XX, ZHOU H, ZENG R, TANG ZY, XIANG QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. **Proteomics**, 4:982-994, 2004.
- EASTMAN A. Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and *cis*-dichloro(ethylenediamine) platinum (II). **Biochemistry**, 22:3927-3933, 1983.
- FAN M, BIGSBY RM, NEPHEW KP. The NEDD8 Pathway Is Required for Proteasome-Mediated Degradation of Human Estrogen Receptor (ER)- and Essential for the Antiproliferative Activity of ICI 162,780 in ER-Positive Breast Cancer Cells. **Molecular Endocrinol**, 17: 356-365, 2003.
- FRITZLER MJ, HAMEL JC, OCHS RL, CHAN KL. Molecular Characterization of Two Human Autoantigens: Unique cDNAs Encoding 95- and 160-kD Proteins of a Putative Family in the Golgi Complex. **J Exp Med**, 178:49-62, 1993.
- FRY, AM. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. **Oncogene**, 21: 6184-6194, 2002.
- GALMARINI CM, MACKAY JR, DUMONTET C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. **Leukemia**, 15:875-890, 2001.
- GREENHALF W, LEE J, CHAUDHURI B. A Selection System for Human Apoptosis Inhibitors Using Yeast. **Yeast** 15:1307-1321, 1999.
- GOTTSMAN MM, FOJO T, BATES SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, 2:48-58, 2002.
- GUERREIRO DS, HU YF, RUSSO IH. S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. **Int J Oncol**, 16:231-240, 2000.
- GUMBINER B.M. Regulation of cadherin adhesive activity. **J Cell Biol**, 148: 399-404, 2000.
- HARPER JW, BURTON JL, SOLOMON MJ. The anaphase promoting complex: it's not just for mitosis any more. **Genes Dev**, 16:2179-2206, 2002.
- HART F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381:571-579, 1996.
- HECKER CM, RABILER M, HANGLUD K. Specification of SUMO1 and SUMO2 interacting motifs. **J Biol Chem**, 23:16117-16127, 2006.
- HISATAKI T, MIYAO N, MASUMORI N. Risk factors for multiple intravesical recurrences of superficial bladder cancer. **Urology**, 58: 935-939, 2001.
- HOFMANN WK, DE VOS S, ELASHOFF D, GSCHAIEMEIER H, HOELZER D, KOEFFLER HP, OTTMANN OG. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene expression study. **Lancet**, 359:481-486, 2002.
- HOLLEMAN A, CHEOK MH, DEN BOER ML, YANG W, VEEMAN AJ, KAZEMIER KM. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. **N Engl J Med**, 351:533-542, 2004.

- JHO EH, ZHANG T, DOMON C, JOO CK, FREUND JN, COSTANTINI F. Wnt/b-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. **Mol Cell Biol**, 22:1172–1183, 2002.
- JOHNSON SK, HAUN RS. The gamma-aminobutyric acid A receptor subunit is overexpressed in pancreatic adenocarcinomas. **JOP J pancreas (Online)**, 6:136-142, 2005.
- KASAI H, NADANO D, HIDAKA E, HIGUCHI K, KAWAKUBO M, NAKAYAMA J. Differential Expression of Ribosomal Proteins in Human Normal and Neoplastic Colorectum. **J Histochem Cytochem**, 51:567-573, 2003.
- KIRKALI Z, CHAN T, MANOHARAN M, ALGABA F, Bush C, Cheng L, et al. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. **Urology**; 66: 4–34, 2005.
- KIM IY, KIM SJ. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. **Cancer Lett**, 241:118-123, 2006.
- KNOWLES MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. **Mol Pathol**, 54:215-21, 2001.
- KORTMANSKY J, SHAH MA, KAUBISCH A. Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, 23:1875–1884, 2005.
- KUMAGAI A, KIM SM, DUNPHY W. G. Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. **J. Biol. Chem**, 279: 49599–49608, 2004.
- KUMANOGOH A, KIKUTANI H. Immune semaphorins: a new area of semaphoring research. **J Cell Sci**, 116: 3463-3470, 2003.
- KUO YC, KUO PL, HSU YL et al. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Life Sci**, 78: 2550-2557, 2006.
- LAFUENTE A, GIRALT M, CERVELLO I, PUJOL F, MALLOL J. Glutathione-S-transferase activity in human superficial transitional cell carcinoma of the bladder Comparison with healthy controls. **Cancer**, 65: 2064-2068, 1990.
- LEE J, KUMAGAI A, DUNPHY WG. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR and RAD17. **Mol Cell**, 11: 329–340, 2003.
- LEUNG JY, KOLLIGS FT, WU R, ZHAI Y, KUICK R, HANASH S, CHO KR, FEARON ER. Activation of AXIN2 expression by b-catenin-T cell factor: a feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. **J Biol Chem**, 277:21657–21665, 2002.
- LIEBER MR, MA Y, PANNICKE U, SCHWARZ K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. **Mol Cell Biol**, 4:712–720, 2003.
- LIM JTE, MANSUKHANI M, WEINSTEIN IB. Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. **PNAS**, 102:5156-5161, 2005.
- LIU X, CAMPBELL MR, PITTMAN GS, FAULKNER EC, WATSON MA, BELL DA. Expression-Based Discovery of Variation in the Human Glutathione S-Transferase M3 Promoter and Functional Analysis in a Glioma Cell Line Using Allele-Specific Chromatin Immunoprecipitation. **Cancer Res**, 65: 99-104, 2005.
- LUO XH, GUO LJ, YUAN LQ, XIE H, ZHOU HD, WU XP, LIAO EY. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. **Exp Cell Res**, 309: 99-109, 2005.
- LYKIDIS A, WANG J, KARIM MA, JACKOWSKI S. Overexpression of a mammalian ethanolamine-specific kinase accelerates the CDP-ethanolamine pathway. **J Biol Chem**, 276:2174–2179, 2001.
- MAGER WH. Control of ribosomal protein gene expression. **Biochim Biophys Acta**, 949:1–15, 1988.

- MEEHAN KL, HOLLAND JW, DAWKINS HJ. Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer. **Prostate**, 50:54–63, 2002.
- MELLO JA, TRIMMER EE, KARTALOU M, ESSIGMAN JM. Conflicting roles of mismatch repair and nucleotide excision repair in cellular susceptibility to anticancer drugs. **Nucleic Acids Mol Biol**, 12:249-274, 1998.
- MERCK O, SPEIT G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environ Mol Mutagen**, 33:167-172, 1999.
- MIKAMI T, OOKAWA K, SHIMOYAMA T. KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor. **J Gastroenterol**, 36:465-469, 2001.
- MIYAZAKI T, BUB JD, UZUKI M, IWAMOTO Y. Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. **Biochem Biophys Res Commun**, 333:79-87, 2005.
- MOREAU A., YOTOV WV, GLORIEUX FH, ST-AMAUDS R. Bonespecific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. **Mol. Cell Biol**, 18:1312-1321, 1998.
- MOUSSA O, YORDY JS, ABOL-ENEIN H, SINHA D, BISSADA NK, HALUSKA PV, GHONEIM MA, WATSON DK. Prognostic and functional significance of Thromboxane synthase gene overexpression in invasive bladder cancer. **Cancer Res**, 65: 11581-11587, 2005.
- MORGAN DO. Principles of CDK regulation. **Nature**, 374:131–134, 1995.
- ORR AW, PALLERO MA, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3- kinase-dependent ERK activation. **J. Biol. Chem**, 277:20453–20460, 2002.
- OSADA YA. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. 2006. Involvement of mitogenactivated protein kinases in class B scavenger receptor type I-induced phagocytosis of apoptotic cells. **Exp. Cell Res**, 312:1820–1830, 2006.
- NABATIYAN A, KRUDE T. Silencing of chromatin assembly factor 1 in human cells leads to cell death and loss of chromatin assembly during DNA synthesis. **Molecular Cellular Biol**, 24:2853-2862, 2004.
- NAGARAJAN UM, BUSHEY A, BOSS JM. Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. **J. Immunol**, 169:5078-5088, 2002.
- OEGEMA K, SAVOIAN MS, MITCHISON TJ, FIELD CM. Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. **J Cell Biol**, 150:539-552, 2000.
- OKAZAKI N, YAN J, YUASA S, UENO T, KOMINAMI E, MASUHO Y, KOGA H., MURAMATSU M. Interaction of Unc-51 like kinase and microtubule associated protein light chain 3 related in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. **Brain Res Mol Brain Res**, 85:1-12, 2002.
- OSTRAKHOVITCH EA, CHERIAN MG. Inhibition of extracellular signal regulated kinase (ERK) leads to apoptosis inducing factor (AIF) mediated apoptosis in epithelial breast cancer cells: the lack of effect of ERK in p53 mediated copper induced apoptosis. **J Cell Biochem**, 95:1120-1134, 2005.
- PAUWELS B, KORST AEC, PATTYN GGO, LAMBRECHTS HAJ. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism *in vitro*. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, 57, 1075-1083, 2003.
- PLANT PJ, LAFONT F., LECAT S, VERKADE P, SIMONS K, ROTIN D. Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. **J Cell Biol**, 149: 1473–1483, 2000.
- QI H, GRENIER J, FOURNIER A, LABRIE C. Androgens differentially regulate the expression of NEDD4L transcripts in LNCaP human prostate cancer cells. **Mol Cell Endocrinol**, 210: 51-62, 2003.
- QURESHI KN, NAGUIB RN, HAMDY FC, NEAL DE, MELLON JK. Neural network analysis of clinicopathological and molecular markers in bladder cancer. **J Urol**, 163:630-633, 2000.

- RADU CG, NIJAGAL A, McLAUGHLIN JM, WANG L, WITTE ON. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. **PNAS**, 102: 1632–1637, 2005.
- RAYMOND JR, MUKHIN YV, GELASCO A, TURNERS J, COLLINSWORTH G, GETTYS TW, GREWA JS, GARNOVSKAYA MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Therapeutics**, 92:179–212, 2001.
- REZNIKOFF CA, SARKAR S, JULICHER KP, BURGER M. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. **Urol Oncol**, 5:191-203, 2000.
- RIBALLO E, DOHERTY AJ, DAI Y, STIFF T, OETTINGER MA, JEGGO PA, KYSELA B. Cellular and Biochemical impact of a mutation in DNA Ligase IV conferring clinical radiosensitivity. **J Biol Chemistry**, 276: 31124-31132, 2001.
- SCHERF U, ROSS DT, WALTHAMAN M, SMITH LH, LEE JK, TANABE L, KOHN KW. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nat Genet**, 24:236–44, 2000.
- SAVOPOULOS JW, CARTER PS, TURCONI S, PETTMAN GR, KARRAN EH, GRAY CW, WARD RV, JENKINS O, CREASY CL. Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. **Protein Expression Purification**, 19:227-234, 2000.
- SMITH JA. Patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder and their smoking status. **Cancer**, 86: 2192-2194, 1999.
- SORENSEN CSRG, SYLJUASEN J, FALCK T, SCHROEDER L, RONNSTRAND K. K, KHANNA BB. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. **Cancer Cell**, 3:247–258, 2003.
- SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98:10869–10874, 2001.
- STAHLE M, VEIT C, U. 2003. Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. **J. Cell Sci**. 116:3835–3846, 2003.
- STILO R, LIGUORO D, DI JESO B, LEONARDI A, VITO P. The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. **Biochem Biophys Res Commun**, 303: 1034-1041, 2003.
- SUIZU F, RYO A, WULF G, LIM J, LU KP. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. **Mol Cell Biol**, 26:1463-1479, 2006.
- SUMARA I, VORLAUFER E, GIEFFERS C, PETERS BH, PETERS JM. Characterization of vertebrate cohesion complexes and their regulation in prophase. **J Cell Biol**, 151: 749-761, 2000.
- SUMI TK., MATSUMOTO K, NAKAMURA T. Specific activation of LIM kinase2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. **J Biol Chem**, 276: 670-676, 2001.
- SUYAMA E, WADHWA R, KAWASAKI H, YAGUCHI T, KAUL SC, NAKAJIMA M, TAIRA K. LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy. **J Gene Med**, 3:357-363, 2004.
- SZAKACS G, ANNAREAU JP, LABABIDI S, SHANKAVARAM U. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, 6:129–137, 2004
- TAKAKU K, OSHIMA M, MIYOSHI H. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. **Cell**, 92:645-656, 1998.
- TENZER A, PRUSCHY M. Potentiation of DNA-damage-induced cytotoxicity by G2 checkpoint abrogators. **Curr Med Chem Anticancer Agents**, 3:35–46, 2003.

- TONG JH, DUPREZ E, LANOTTE M. JEM-1, a novel nuclear co-factor: localisation and functional interaction with AP-1. **Leukemia**, 13:1982-1992, 1999.
- VAN DE VIJVER MJ, HE YD, VAN'T VEER LJ, DAI H. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**, 347:1999–2009, 2002.
- VAN'T VEER LJ, DAI H, VAN De VIJVER MJ. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, 415:530–536, 2002.
- VON DER MAASE H, HANSEN SW, ROBERTS JT. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. **J Clin Oncol**, 18:3068-3077, 2000.
- VYAS P, NORIS FA, JOSEPH R, MAJERUS PW, ORKIN SH. Inositol polyphosphate 4 phosphatase type 1 regulates cell growth downstream of transcription factor GATA 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 13696-13701, 2000.
- WANG CCC, CHIANG Y-M, KUO P-L et al. Norsolorinic acid inhibits proliferation of T24 human bladder cancer cells by arresting the cell cycle at the Go/G1 phase and inducing a fas/membrane-bound fas ligand-mediated apoptotic pathway. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 35: 1301-1308, 2008.
- WOODS SA, MARMOR E, FELDKAMP M, LAU N, APICELLI AJ, BOSS G, GUTMANN DH, GUHA A. Aberrant G protein signaling in nervous system tumors. **J Neurosurg**, 97:627-64, 2002.
- WU K, CHEN A, PAN ZQ. Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. **J Biol Chem**, 275: 32317–32324, 2000.
- YAMAMOTO T. Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer. **Pathol Int**, 50:863–871, 2000.
- YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, TSUCHIDA A, YOKOMIZO T, KITA S. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, 423: 762-769, 2003.
- YANG Z, VENARDOS K, JONES M. Identification of a novel polymorphisms in the 3'UTR of the L-Arginine transporter gene SLC7A1: Contribution to hypertension and endothelial dysfunction. **Circulation**, 115:1269-1274, 2007.
- ZAFARANA G, GILLIS AJM, VAN GURP RJHLM, OLSSON PG, ELSTRODT F, STOOP H, MILLA'n JL, OOSTERHUIS W, LOOJENGA HJ. Coamplification of DAD-R, SOX5, and EKL1 in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifestation. **Cancer Res**, 62:1822-1831, 2002.
- ZEMBUSU H, OHNISHI Y, TSUNODA T, FURUKAWA. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. **Cancer Res**, 62:518-527, 2002
- ZHANG L, DING F, CAO W, LIU Z, LIU W. Stomatin-like Protein 2 Is Overexpressed in Cancer and Involved in Regulating Cell Growth and Cell adhesion in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Clin Cancer Res**, 12: 1639-1646, 2006.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, sobre os efeitos citotóxicos e toxicogênicos da cisplatina e gencitabina em três linhagens de CCT de bexiga (RT4, de tumor grau 1 e *TP53* selvagem; 5637, de grau 2 e *TP53* mutado; T24, de grau 3 e *TP53* mutado), permitiram as seguintes conclusões:

- 1 – os tratamentos com as drogas antineoplásicas induziram alterações na expressão de genes relacionados à apoptose, ao reparo de danos no DNA e a constituintes celulares;
- 2 – as células de grau 1 e *TP53* selvagem (RT4) foram as mais resistentes ao tratamento com a cisplatina, apresentando maiores taxas de sobrevivência;
- 3 - o tratamento com a cisplatina induziu atraso no ciclo das três linhagens celulares;
- 4 – a cisplatina induziu taxas significativas de apoptose somente na linhagem celular de grau 1 e *TP53* selvagem (RT4), indicando que outras vias seriam as principais responsáveis pela morte celular em linhagens de mais alto grau e *TP53* mutantes;
- 5 - os tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina/gencitabina induziram parada do ciclo celular na fase G1 para as três linhagens, até 72 horas após a exposição às drogas;
- 6 – as células de grau 1 e *TP53* selvagem (RT4) foram as mais sensíveis ao tratamento com a gencitabina, apresentando as menores taxas de sobrevivência clonogênica;
- 7 – o tratamento combinado cisplatina/gencitabina induziu baixas taxas de sobrevivência nas três linhagens celulares, independente do grau tumoral e *status* do gene *TP53*;
- 8 – maior semelhança de perfil de expressão gênica foi observado entre as células das linhagens de tumor grau 1 e *TP53* selvagem e a de grau 3 e *TP53* mutado, especialmente dos genes relacionados à apoptose e à progressão tumoral.
- 9 - o tratamento combinado cisplatina/gencitabina induziu grandes alterações no padrão de expressão gênica, especialmente sobre os genes relacionados à inibição da proliferação celular, em todas as linhagens celulares.

Finalizando, concluímos que o tratamento combinado cisplatina/gencitabina foi o que se mostrou mais efetivo na ação anti-proliferativa em linhagens de carcinoma de células transicionais de bexiga.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aaltonen V, Bostrom PJ, Soderstrom KO, Hirvonen O, Tuukkanen J, Nurmi M, et al. Urinary bladder transitional cell carcinogenesis is associated with down-regulation of NF1 tumor suppressor gene in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1999; 154: 755-65.

Amudson SA, Bittner M, Chen Y, Trent J, Meltzer P, Fornace AJ. Fluorescent cDNA microarray hibridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene.* 1999; 18:3666-72.

Baithun SI, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch.* 2001; 438:289-97.

Beljansk, V, Marzilli LG, Doetsch PW. DNA-Damage-Processing pathways involved in the Eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol Pharmacol.* 2004; 65:1496-506.

Ban N, Takahashi Y, Takayama T, Kura T, Katahira T, Sakamaki S, et al. Transfection of glutathione S-transferase (GST)- antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.* 1996; 56: 3577-82.

Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A. The health economics of bladder câncer – a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics.* 2003; 21: 1315-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Divisão de Epidemiologia e Avaliação/CONPREV/MS. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 1999. Rio de Janeiro: INCA; 1999.

Catto JWF, Meuth M, Hamdy FC. Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int.* 2004; 93: 19-24.

Chen Y, Sanchez Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair,* 2004; 3:1025–1032.

Chester JD, Hall GD, Forster M, Protheroe AS. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer – current controversies and future directions. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30: 343-58.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

- Cho SG, Bhoumik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, Ronai Z. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2001; 21:8398-413, 2001.
- Crul M, Waardenburg CAM, Bocxe S, Eijndhoven MAJ, Pluim D, Beijnen JH, et al. DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 275-82.
- Damia G, Guidi G, D'incalci M. Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 1998; 34: 1783-8.
- Darroudi F, Wiegant W, Meijers M, Fridl AA, Van Der Burg M, Fomina J. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutat Res*, 2007; 3:111-124, 2007.
- Dyrskjot L, Kruhoffer M, Thykjaer T, Marcussen N, Jensen JL, Moller K, et al. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res*. 2004; 64: 4040-8.
- Eastman A. Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and *cis*-dichloro(ethylenediamine) platinum (II). *Biochemistry*. 1983; 22:3927-33.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429:457-63.
- Elsamman E, Fukumori T, Ewis AA, Ali N, Kajimoto K, Shinohara Y, et al. Differences in gene expression between noninvasive and invasive transitional cell carcinoma of the human bladder using complementary deoxyribonucleic acid microarray: preliminary results. *Urol Oncol*. 2006; 24:109-15.
- Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA Mismatch repair. *Cancer Res*. 1997; 57:1841-5.
- Friederich MG, Riethdorf S, Erbersdobler A, Tiemer C, Schwaibold H, Solter JK, et al. Relevance of p53 gene alterations for tumor recurrence in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2001; 39:159-66.
- Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. *Int J Cancer*. 2001; 91: 575-9.
- Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Br J Cancer*. 2006; 94:1087-92.
- Goan YG, Zhou B, Hu E, Mi S, Yen Y. Overexpression of Ribonucleotide Reductase as a mechanism of resistance to 2,2-Dicfluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res*. 1999; 59:4204-7.

- Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS, Afshari CA. An overview of toxicogenomics. *Curr Issues Mol Biol.* 2002; 4:45-56.
- Hao SY, Qing Y, Hui WL, Li G, Rong T, Kang Y, et al. Monitoring gene expression profile changes in bladder transitional cell carcinoma using cDNA microarray. *Urol Oncol.* 2002; 7:207-12.
- Harris AL. Bladder cancer – field origin versus clonal origin. *N Eng J Med.* 1992; 326:759-61.
- Hayes KR, Bradfield CA. Advances in Toxicogenomics. *Chem Res Toxicol.* 2005; 18:403-14.
- Hisataki T, Miyao N, Masumori N, Takahashi A, Yanase M, Itoh N, et al. Risk factors for multiple intravesical recurrences of superficial bladder cancer. *Urology.* 2001; 58: 935-9.
- Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 1991; 51:6110-7.
- Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. *BRCA1* up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 1998; 58:1120-3.
- Kausch I, Bohle A. Molecular Aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol.* 2002; 41:15-29.
- Kim IY, Kim SJ. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006; 241:118-23.
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Bush C, Cheng L, et al. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005; 66: 4–34.
- Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol.* 2001; 54:215-21.
- Kortmansky J, Shan MA, Kaubisch A. Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol,* 2005; 23:1875–1884.
- Kumagai A, Kim SM, Dunphy W. G. Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. *J Biol Chem,* 2004; 279, 49599–49608.
- Langbein S, Brade J, Badawi JK, Hatzinger M, Kaltner H, Lensch M, et al. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology.* 2007; 51:681-90.
- Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR and RAD17. *Mol Cell,* 2003; 11: 329 –340.

Lee K-M, Kim J-H, Kang D. Design issues in toxicogenomics using DNA microarray experiment. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 2005; 207 suppl 2:200-8.

Lewis AS. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278:F867-74.

Liu X, Campbell MR, Pittman GS, Faulkner EC, Watson MA, Bell DA. Expression-Based Discovery of Variation in the Human Glutathione S-Transferase M3 Promoter and Functional Analysis in a Glioma Cell Line Using Allele-Specific Chromatin Immunoprecipitation. *Cancer Res.* 2005; 65: 99-104.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev.* 2003; 3:330-8.

Marsit CJ, Houseman EA, Christensen BC, Eddy K, Bueno R, Sugarbaker DJ, et al. Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors. *Cancer Res.* 2006; 66:10621-9.

Mello JA, Trimmer EE, Kartalou M, Essigmann JM. Conflicting roles of mismatch repair and nucleotide excision repair in cellular susceptibility to anticancer drugs. *Nucleic Acids Mol Biol.* 1998; 12:249-74.

Nagata Y, Abe M, Kobayashi K, Saiki S, Kotake T, Yoshikawa K. Point mutations of c-ras genes in human bladder cancer and kidney cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1990; 81:22-7.

Nagatani G, Nomoto M, Takano H, Ise T, Kato K, Imamura T, et al. Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61:1592-7.

Olden K, Guthrie J, Newton S. A bold new direction for environmental health research. *Am J Public Health.* 2001;91: 1964-7.

Orphanides G. Toxicogenomics: challenges and opportunities. *Toxicol Lett.* 2003;140-1:145-8.

Pauwels B, Korst AEC, Pattyn GGO, Lambrechts HAJ, Bockstaele DRV, Vermeulen K, et al. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro. *Int J Radiat Biol Phys.* 2003; 57:1075-83.

Peters GJ, Ruiz Van Haperen VWT, Bergman AM. Preclinical combination therapy with gemcitabine and mechanisms of resistance. *Semin Oncol.* 1996; 23:16-24.

Qureshi KN, Naguib RN, Hamdy FC, Neal DE, Mellon JK. Neural network analysis of clinicopathological and molecular markers in bladder cancer. *J Urol.* 2000; 163:630-3.

- Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, et al. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol*. 2000; 5:191-203.
- Rosell R, Lord RVN, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 38:217-27.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, Lu M, Prystowsky M, Childs G, et al. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res*. 2002; 62:6973-80.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, et al. Gene Discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol*. 2003;163:505-16.
- Sheng KH, Yao YC, Chuang SS, Wu H, Wu TF. Search for the tumor-related proteins of transition cell carcinoma in Taiwan by proteomic analysis. *Proteomics*. 2006; 6:1058-65.
- Simmons PT, Portier CJ. Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis*. 2002; 23:903-5.
- Smith JA. Patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder and their smoking status. *Cancer*. 1999; 86:2192-4.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:10869–10874.
- Sun D, Urrabz R, Kelly S, Nguyen M, Weitman S. Enhancement of DNA ligase I level by gemcitabine in human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:1189-95.
- Tennant RW. The National Center for Toxicogenomics: using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environ Health Perspect*. 2002; 110:A8-10.
- Tenzer A, Pruschy M. Potentiation of DNA-damage-induced cytotoxicity by G2 checkpoint abrogators. *Curr Med Chem Anticanc Agents*, 2003; 3:35–46.
- Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*. 1990; 50:44-7.
- Turker MS, Bestor TH. Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutat Res*. 1997; 386:119-30.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002; 347:1999–2009.

van't Veer LJ, Dai H, van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002; 415:530-6.

Wilson CB, Leopard J, Cheresch DA, Nakamura RM. Extracellular matrix and integrin composition of the normal bladder wall. *World J Urol*. 1996; 14:S30-7.

Yu MC, Skipper PL, Taghizadeh K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson BE, et al. Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adducts levels, and bladder cancer risk in white, black and Asian men in Los Angeles. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86:712-6.

Yu MC, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, Ross RK [review]. Arylamines exposures and bladder cancer risk. *Mutat Res*. 2002; 506-507:21-8.

Zdraveski ZZ, Mello JA, Marinus MG, Essigmann JM. Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chem Biol*. 2000; 7:39-50.

Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagir T, Ueyama Y, et al. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res*. 2002; 62:518-27.