Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2015;36(2):213-218
ISSN 1808-4532

A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA

Juliana Ferreira de Sousa[1]; Luis Fernando Di Cristofaro[1]; Rodolfo Bortolozo Serafim[1]; Renato Petitto Netto[1]; Felipe de Oliveira Souza[1]; Christiane Pienna Soares[1]; Valeria Valente[1, 2]

[1] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, SP, Brasil.
[2] Universidade de São Paulo (NAP/USP), Center for Integrative Systems Biology (CISBi), Núcleo de Apoio à Pesquisa da Ribeirão Preto, SP, Brasil.

RESUMO

Os gliomas são tumores cerebrais definidos patologicamente pela presença de células com características histológicas e imuno-histoquímicas que evidenciam diferenciação glial. Dentre eles, os astrocitomas são os mais frequentes em adultos. Estes tumores normalmente apresentam infiltração difusa no tecido adjacente, são resistentes aos tratamentos e têm uma tendência natural para a progressão maligna. O tratamento padrão atual consiste na realização de ressecção cirúrgica do tecido tumoral seguida de radio e quimioterapia concomitantes, porém o prognóstico permanece extremamente pobre. O quimioterápico padrão-ouro no tratamento de GBM é o agente alquilante de DNA temozolamida (TMZ). Entretanto, os danos induzidos pela TMZ podem ser revertidos pela ação da maquinaria de reparo de DNA, impedindo a morte celular e levando à resistência do GBM ao tratamento. No presente estudo correlacionamos a expressão dos genes *ATM, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2*, **envolvidos em reparo de DNA e sabidamente superexpressos em GBM, com a resistência das linhagens celulares T98G e U87MG ao tratamento com TMZ. Mostramos que a linhagem T98G é a mais resistente ao tratamento com TMZ, e apresenta superexpressão de** *BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2* **e sub-expressão de ATM. Vimos também que a linhagem U87MG, mais sensível ao tratamento com TMZ, apresenta expressão reduzida dos genes** *ATM, BRCA2 e EXO1*. **Portanto, estes dados sugerem uma correlação positiva entre a expressão de genes de reparo de DNA e a resistência das células de GBM à TMZ.**

Palavras-chave: glioblastoma, T98G, U87MG, genes de reparo de DNA, resistência e temozolamida.

Autor correspondente: Valeria Valente. Rua Expedicionários do Brasil, 1621. CEP 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. E-mail: valentev@fcfar.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os gliomas são tumores cerebrais definidos patologicamente pela presença de células com características histológicas e imuno-histoquímicas que evidenciam diferenciação glial. De acordo com os tipos celulares que predominam na massa tumoral eles são classificados como astrocitomas, oligodendrogliomas ou tumores mistos, os oligoastrocitomas (Vescovi et al., 2006). Dentre eles, os astrocitomas são os mais frequentes em adultos. Estes tumores normalmente apresentam infiltração difusa no tecido adjacente, são resistentes aos tratamentos e têm uma tendência natural para a progressão maligna, sendo classificados em quatro graus de acordo com suas características histológicas e comportamento biológico. Os tumores de grau I (astrocitomas pilocíticos) são benignos, apresentam células bem diferenciadas e com baixas taxas de proliferação, sendo curáveis quando a remoção cirúrgica é possível. Os tumores de grau II (astrocitomas difusos) apresentam células diferenciadas e com proliferação moderada, mas devido à infiltração difusa no tecido adjacente não são curáveis através de ressecção cirúrgica e, em aproximadamente 70% dos casos, evoluem para grau III e IV dentro de 5 a 10 anos. Os tumores de grau III (astrocitomas anaplásicos) apresentam grande anaplasia e taxas de proliferação mais elevadas do que os gliomas de grau II, sendo portanto, de evolução mais rápida e levam os pacientes a óbito em poucos anos. Os tumores de grau IV, denominados glioblastomas multiformes (GBMs), exibem as características de malignidade mais agressivas, como: anaplasia e proliferação celular muito elevadas, extensa infiltração difusa, presença de angiogênese e necrose (Denysenko et al., 2010).

O glioblastoma multiforme, além de mais agressivo, é o tipo mais frequente de astrocitoma e representa um grave problema de saúde pública. Devido a alta agressividade e resistência dos GBMs à radioterapia e quimioterapia, os pacientes acometidos apresentam sobrevida média de apenas 6 a 12 meses após o diagnóstico (Skalli et al., 2013). O tratamento padrão atual consiste

na realização de ressecção cirúrgica do tecido tumoral seguida de radio e quimioterapia concomitantes, porém o prognóstico permanece extremamente pobre. Isto se deve a alta invasividade e a resistência extremamente elevada das células de GBM, que promovem a recidiva em praticamente todos os casos (Sze et al., 2013; Agnihotori et al., 2013).

Na quimioterapia podem ser usados fármacos intercalantes ou alquilantes de DNA e inibidores de topoisomerases 1 e 2 (Bai et al., 2011), sendo o quimioterápico padrão-ouro no tratamento de GBM o agente alquilante de DNA temozolamida (TMZ) (Sze et al., 2013). A nível molecular, a quimio e radioterapias são baseadas na indução de lesões no DNA das células tumorais, o que promoveria a morte destas células (Santivasi & Xia, 2013). Entretanto, os danos induzidos podem ser revertidos pela ação da maquinaria de reparo de DNA, o que pode impedir a morte celular caso o reparo ocorra de forma rápida e eficiente. Um exemplo disso é a associação entre os níveis de expressão proteína O^6-metilguanina metiltransferase (MGMT), responsável pela desmetilação do DNA, e o prognóstico de sobrevida dos pacientes. O status de metilação do promotor do gene *MGMT* está associado com a melhor resposta dos pacientes ao tratamento com TMZ (Hegi et al., 2005; Qiu et al., 2013). Outros genes de reparo de DNA também podem estar associados com a resistência do GBM à radio e à quimioterapia. Estes genes podem pertencer a diversas vias de reparo de DNA como: excisão de nucleotídeos (NER – *Nucleotide Excision Repair*), excisão de bases (BER – *Base Excision Repair*), pareamento incorreto de bases (MMR - *Mismatch Repair*), recombinação homóloga (HR – *Homologus Recombination*) e ligação de extremidades não-homólogas (NHEJ – *Non-Homologus End Joining*) (Hoeijmakers, 2001).

A ativação de um gene de reparo de DNA depende do tipo de dano causado, seja por um agente químico ou físico. No caso da TMZ, é possível que ocorra a ativação da maioria das vias de reparo. A TMZ, em pH fisiológico, é convertida a 5-3- (methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide (MTIC) e então é degradada ao cátion metildiazólio que é capaz de metilar o DNA. Essas metilações ocorrem em diferentes regiões do DNA com frequências distintas: na posição N3 da adenina (10-20%), e nas posições O6 (5-10%) e N7 da guanina (60-80%). Embora seja a menos frequente, a metilação em O6 é o dano que mais efetivamente induz efeito citotóxico e é reparado principalmente pelo produto do gene MGMT. Quando *MGMT* repara o dano em O6, O6-MeG pode parear com uma citosina ou timina e então é ativada a via MMR. Caso esta via não seja capaz de realizar o reparo, ocorre quebra na dupla fita de DNA provocando o recrutamento dos genes das vias de reparo HR ou NHEJ, o que pode levar ao reparo do dano ou a ativação do processo de morte celular. Quando a metilação ocorre nas posições N3 da adenina e/ou N7 da guanina há reconhecimento pela via de BER. Se esta via não é capaz de reparar o dano, pode ocorrer quebra de fita simples de DNA e consequente ativação de genes da via de reparo correspondente ou pode ocorrer quebra de fita dupla, ativando HR ou NHEJ (Yoshimoto et al., 2012). Desse modo, a investigação dos níveis de expressão de genes de reparo DNA em células normais e tumorais, pode fornecer subsídios para o melhor entendimento das vias celulares que estão associadas com a resistência das células de GBM aos agentes genotóxicos. No presente estudo, através de ensaios de PCR quantitativo e MTT, correlacionamos a expressão de genes envolvidos na sinalização do dano e no reparo de DNA com a resistência das células de GBM T98G e U87MG à TMZ. Os genes avaliados foram: *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated), *BRCA2* (*Breast Cancer* 2), *BRIP1* (*BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase* 1), EXO1 (*Exonuclease* 1), *NEIL3* (*Nei Endonuclease VIII-like* 3), *RAD54L* (*RAD54-Like*) e *XRCC2* (*X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2*), que demonstramos previamente terem expressão alterada nos astrocitomas (dados não publicados). A *ATM* é uma proteína quinase que reconhece e sinaliza a ocorrência de danos no DNA, ativando a maquinaria de reparo. BRCA2, BRIP1, *RAD54L* e *XRCC2* são proteínas envolvidas na execução do reparo através do mecanismo de HR. *NEIL3* é uma glicosilase que participa do reparo através do mecanismo de BER e EXO1 atua no reparo pelo mecanismo de MMR. Neste estudo mostramos que a linhagem T98G é a mais resistente ao tratamento com TMZ e apresenta superexpressão de BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, *RAD54L* e XRCC2, e sub-expressão de ATM. Observamos também que a linhagem U87MG, mais sensível ao tratamento com TMZ, apresenta expressão reduzida dos genes *ATM, BRCA2 e EXO1*, sendo que os demais genes avaliados não apresentaram alteração significativa. Portanto, estes dados sugerem uma correlação positiva entre a expressão de genes de reparo de DNA e a resistência das células de GBM à temozolamida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares e cultivo celular

As linhagens celulares de glioblastoma utilizadas (U87MG e T98G) são comercialmente disponíveis e foram obtidas da coleção ATCC (HTB-14 e CRL-1690, respectivamente). Como controle não-tumoral foram utilizadas as células RO, fibroblastos isolados da pele do prepúcio de um homem saudável de 23 anos de idade em 2005 no laboratório da Dra. E. Espreafico. Essas células foram cultivadas em mistura 1:1 de meio de cultura DMEM (Gibco) e Ham's F10 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas-SP, Brasil) e 100U/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich), mantidas em estufa à 37ºC a 5% de CO2.

Extração de RNA e PCR em tempo real

A extração de RNA total das células em cultura foi realizada utilizando-se o kit RNeasy RNA Extraction (Qiagen). Para a extração do RNA, cada linhagem celular foi cultivada em condições padrão em placas de 6 poços. Em seguida, todo o meio foi retirado e adicionou-se 350 µL de tampão de lise em cada poço. Após a lise, foi adicionado

350 µL de etanol 70% diluído em água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato e autoclavada) para precipitação das proteínas. Em seguida, todo o volume foi transferido para a coluna de afinidade e centrifugou-se por 30 segundos a 12000 RPM. Após centrifugação, foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem e centrifugou-se por 30 segundos a 12000 RPM. O processo de lavagem foi realizado duas vezes. Por fim, o RNA foi eluído com 50 µL de água DEPC. Uma alíquota foi analisada em espectrofotômetro a 260-280 nm para determinação da concentração e pureza.

Para a transcrição reversa do RNA foi utilizado o kit "High Capacity cDNA Archive" (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a PCR em tempo real foi utilizado o sistema baseado no fluorocromo SYBR, através do kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems®) de acordo com as condições padrões recomendadas pelo fabricante. Os oligonucleotídeos específicos para cada gene em estudo e para o gene *HPRT* (Tabela 1), que foi utilizado como controle, foram desenhados com o programa Oligo Explorer 1.4 e sintetizados pela Invitrogen®.

Ensaio de citotoxicidade

Foram realizados os ensaios de brometo de 3-(4,5–dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que estimam indiretamente a quantidade de células vivas. O sal de coloração amarela é reduzido pela succinato-desidrogenase mitocondrial e forma um composto de coloração violeta, cuja intensidade é proporcional à quantidade de células vivas (Buch et al., 2012). Esse ensaio foi realizado após 24 horas de exposição à TMZ (Temodal, fabricado pela Scheringplough). A TMZ utilizada nos ensaios foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr. A TMZ em pó, retirada do interior da cápsula, foi dissolvida em água na proporção de 100mg de TMZ para 1ml de água. Para a realização do ensaio do MTT, uma alíquota de 4µl desta solução foi diluída em 1020µl de meio de cultura (sem soro fetal bovino) para que se obtivesse uma solução de trabalho na concentração de 1000µM. As soluções nas outras concentrações utilizadas foram obtidas a partir da diluição seriada desta solução 1000µM.

Análise estatística

A estimativa da quantidade relativa de mRNA de cada gene analisado, nas linhagens celulares tumorais (U87MG e T98G) em relação ao nível de expressão das células RO, foi feita com o cálculo do 2^{-DDCt} (Livak & Schmittgen, 2001). Para a normalização dos dados, foi utilizado o gene *HPRT* cujos níveis de expressão não apresentam diferenças significativas entre células normais e tumorais (Valente et al., 2009). Após o cálculo do 2^{-DDCt}, procedeu-se a análise estatística de variância com o software "GraphPad Prisma", utilizando o Teste T (ANOVA), seguido do teste de Dunnet, que compara o grupo controle com cada um dos grupos-teste. Este pós-teste foi escolhido para comparar a expressão dos genes em estudo entre as células tumorais e a linhagem não-tumoral.

Para análise do teste de viabilidade celular (MTT) foi utilizado o método One-way ANOVA seguido do teste de Tukey, que compara todos os grupos analisados dois a dois. Este teste foi escolhido para possibilitar a comparação do controle negativo com cada concentração de TMZ e também das diferentes concentrações de TMZ entre si. Esta análise foi necessária para a identificação das linhagens mais sensível e mais resistente. Em ambas as análises estatísticas realizadas, os resultados que apresentaram valores de P<0,01 foram considerados significativos.

RESULTADOS

As células de GBM T98G são mais resistentes que U87MG ao tratamento com TMZ

Em um estudo prévio foi realizada uma análise do efeito de diferentes concentrações de TMZ sobre a viabilidade celular, variando de 100 a 1000µM. A partir dessa avaliação, escolhemos trabalhar com a concentração de 800µM de TMZ, pois esta é a concentração mínima capaz de induzir redução na viabilidade celular (Di Christófaro, 2012 – dados não publicados). Todas as linhagens avaliadas apresentaram alguma sensibilidade ao tratamento com TMZ nesta concentração. As células RO, U87MG e T98G apresentaram 76%, 42% e 91,6% de viabilidade, respectivamente, após 24h de tratamento. Desse modo, U87MG mostrou-se a linhagem mais sensível e T98G a mais resistente. Comparando-se as linhagens tumorais com a linhagem não-tumoral RO, somente a U87MG apresentou diferença significativa (**P<0,01), e comparando-se as linhagens tumorais entre si observamos variação significativa na viabilidade (***P<0,001) (Figura 1).

Expressão de genes envolvidos em reparo de DNA nas células T98G e U87MG

Para investigar se há relação entre o padrão de expressão de genes das vias de reparo de DNA com a resistência das células tumorais ao tratamento com TMZ, foram feitas reações de PCR para amplificação dos genes *ATM, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2* nas linhagens de GBM T98G e U87MG nas células não tumorais RO. Todos os genes avaliados mostraram-se significativamente mais expressos na linhagem T98G em comparação com a RO (*P<0,1; **P<0,01; ***P<0,001), excetuando-se apenas ATM. No caso deste gene, detectamos sub-expressão significativa (***P<0,001) em ambas as linhagens tumorais. Na linhagem U87MG, também observamos expressão reduzida para os genes *BRCA2* (**P<0,01) e EXO1 (*P<0,1), enquanto que os outros genes avaliados, BRIP1, NEIL3, *RAD54L* e XRCC2, não apresentaram diferença significativa (Figura 2, Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que a linhagem T98G é a mais resistente ao tratamento com TMZ e apresenta superexpressão de todos os genes de reparo de

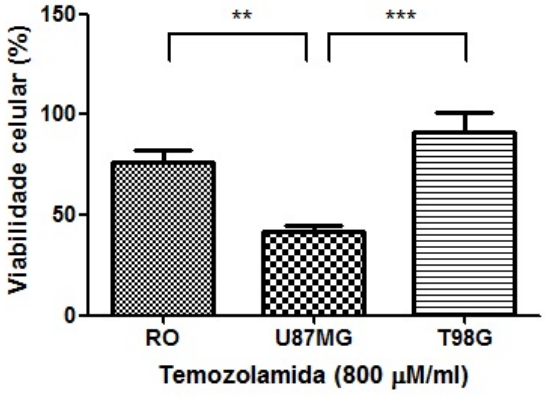

Figura 1 - As células T98G e RO são mais resistentes a TMZ que as células U87MG. Percentual de células viáveis após tratamento de 24h com TMZ (800µM/ml). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT. O gráfico foi plotado com o software GraphPad Prism 6.0 e foi realizado teste estatístico One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.
**P<0,01
***P<0,0001

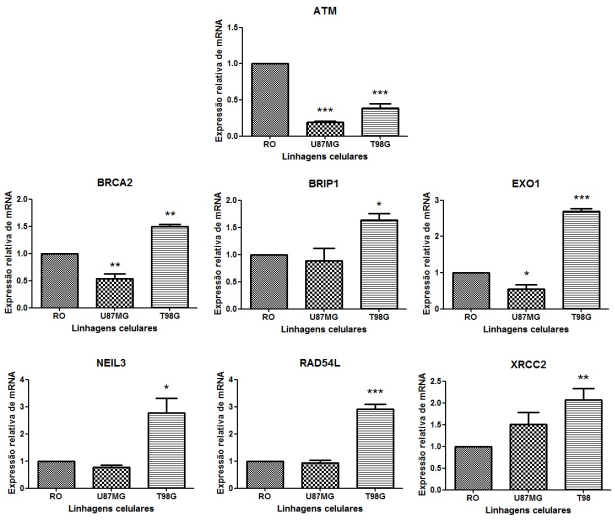

Figura 2 - A expressão da maioria dos genes avaliados é aumentada na linhagem T98G. Os níveis de expressão dos genes *ATM, BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2* nas linhagens celulares RO, U87MG e T98G, foram avaliados por RT-PCR quantitativa. Análise estatística: one-way ANOVA seguido do teste de Dunnet. Os gráficos foram plotados no software GraphPad Prism 5.0.
*P<0,01
**P<0,001
***P<0,0001.

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

Gene	Sequência forward	Sequência reverse
ATM	5'-GTGCCTTGGCTACAGATTGC-3'	5'-ACGTTCCCCATGTCGCTGTT-3'
BRCA2	5´-CAGGGCCGTACACTGCTCAA-3´	5´-GGGCTGAGACAGGTGTGGAA-3´
BRIP1	5´-CCAGACTGTGAGCCAAGGAA-3´	5´-CTCCTCCCTGTGGTTCTACA-3´
EXO1	5´-CCAGACCTCCAAGCTACGTT-3´	5´-TCTGGCAGGTCCTAGAGGTT-3´
NEIL3	5´-TGGTCTCCACCCAGCTGTTA-3´	5´-CCTGCTTTACGGCACCTGTA-3´
RAD54L	5´-GGGTCTGGCGAGATGGTCAA-3´	5´-CCACCACACAGCTGCTCAGT-3´
XRCC2	5´-CCTTGCCCGACTTGAAGGTA-3´	5´-CTGTTCCTTCTGGGCCATGA-3´

Tabela 2 - Razão da expressão relativa entre as linhagens tumorais e as células RO.

GENE	linhagem	
	U87MG	T98G
ATM	0,19196	0,39106
BRCA2	0,54043	1,49365
BRIP1	0,88540	1,63638
EXO1	0,54715	2,69609
NEIL3	0,77541	2,77015
RAD54L	0,94278	2,90667
XRCC2	1,50556	2,07161

DNA avaliados. Vimos também que a linhagem U87MG é a mais sensível ao tratamento com TMZ e apresenta expressão reduzida dos genes *BRCA2* e EXO1, sendo que os demais genes avaliados não apresentaram alteração significativa no nível de expressão. Em concordância com estes dados, já foi demonstrado que a superexpressão de APEX1, uma endonuclease envolvida na via de reparo por BER, promove resistência de GBM ao tratamento com TMZ (Bobola et al, 2012) e tem sido associada com maior agressividade do tumor (Tell et al., 2005). Foi visto também que células tumorais que não expressam *BRIP1* são extremamente sensíveis a agentes indutores de ligação covalente cruzada na dupla fita de DNA, como cisplatina e mitomicina C (Litman et al., 2005; Levitus et al., 2005; Levran et al., 2005) e essa condição é revertida pela complementação com *BRIP1* selvagem (Cantor et al., 2001; Peng et al., 2007; Wu & Brosh, 2009). Outro trabalho conduzido por Zheng e colaboradores (2012) mostra que *XRCC2* e XRCC4 são superexpressos em linhagens celulares e amostras tumorais de GBM e o silenciamento destes genes sensibiliza as células tumorais à radioterapia. Dessa maneira, a literatura concorda com os dados obtidos neste estudo e, conjuntamente, sugerem que a superexpressão de genes de reparo de DNA pode estar envolvida em mecanismos de resistência ao tratamento.

Interessantemente, observamos que o gene ATM, que codifica uma proteína sinalizadora do dano ao DNA, é significantemente sub-expresso em ambas as linhagens tumorais. Esta alteração provavelmente está relacionada com os eventos de tumorigênese que levaram ao

estabelecimento do tumor, pois a perda de genes que atuam na sinalização de dano é frequente no início da progressão tumoral (Bartek et al., 2007; Bartek et al., 2012). Além disso, é sabido que a alquilação O6-metilguanina gerada pela ação da TMZ provoca a ativação de ATM, desencadeando uma cascata de sinalização de danos no DNA e reparo que é capaz de proteger as células LN229 de GBM da ação da TMZ (Eich et al., 2013). Assim, a subexpressão ou inibição de *ATM* deixaria as células mais sensíveis à ação da TMZ, fato já observado por A. Nadkarni e colaboradores (2012) nas linhagens U87MG e U251MG. Porém, algumas células deficientes em *ATM* apresentam reparo efetivo por BER e fosforilação normal de H2AX, CHK1 e CHK2 após tratamento com TMZ (Eich et al., 2013), o que indica que a atividade de reparo depende de um conjunto de fatores e pode ser ativada através de diferentes mecanismos de sinalização.

Portanto, estes dados sugerem que a maior ou menor resistência das células tumorais ao agente genotóxico depende do conjunto de alterações genéticas que ela apresenta. As células T98G (resistentes), apesar de expressarem baixos níveis de ATM, tem expressão muito elevada de vários genes envolvidos com a execução do reparo. Já as células U87MG (sensíveis), além de expressarem baixos níveis de ATM, também apresentam sub-expressão de EXO1 e *BRCA2* e não tem aumento significativo nos outros genes avaliados. Conjuntamente, estes resultados sugerem uma correlação positiva entre a ativação das vias de reparo de DNA e a resistência das células de GBM à temozolamida. Futuramente, devemos aprofundar este estudo avaliando o padrão de ativação dos genes de reparo e os mecanismos de morte após o tratamento com TMZ. Neste sentido, pretendemos realizar uma cinética de avaliação da expressão gênica, e quantificação dos níveis de quebra no DNA e apoptose pós-tratamento. Assim, poderemos elucidar melhor a relação dos genes de reparo com a resistência das células à ação da TMZ e ativação dos mecanismos de morte celular.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente à Profª Drª Enilza Maria Espreafico que gentilmente cedeu as células RO para o nosso estudo, e ao técnico Marcos Dangona pelo suporte na manutenção dos materiais para cultivo celular. Agradecemos também ao apoio financeiro da FAPESP (n. processo 2012/16877-6), CAPES/PROEX e PADC (n. processo 67/2012).

ABSTRACT

The resistance of T98G and U87MG cell lines to temozolomide is correlated with the expression of DNA repair genes

Gliomas are brain tumors pathologically defined by the presence of cells with histological and immunohistochemical characteristics of glial differentiation. Among them, astrocytomas are the most common in adults. These tumors usually show diffuse infiltration into adjacent tissue, are resistant to treatment and have a natural tendency to malignant progression. The current standard treatment consists in surgical removal of the tumor followed by radiotherapy and concurrent chemotherapy. However, the prognosis remains extremely poor. The first line chemotherapy for GBM treatment is the DNA alkylating agent temozolamide (TMZ). Nevertheless, TMZ-induced damage can be reversed by the action of DNA repair machinery that prevents cell death and leads to relapse. In this study we correlated the expression of the DNA damage-signaling gene, *ATM* kinase, and the DNA repair genes BRCA2, BRIP1, EXO1, NEIL3, *RAD54L* and XRCC2, with the resistance of T98G and U87MG cell lines to TMZ. T98G cells were more resistant to TMZ treatment and showed overexpression of all DNA repair genes, while *ATM* kinase was down regulated. We also observed that U87MG cells, more sensitive to TMZ, have reduced expression of ATM, *BRCA2* and EXO1. Therefore, these data suggest a positive correlation between the expression of DNA repair genes and the resistance of GBM cells to TMZ.

Keywords: Glioblastoma. T98G. U87MG. DNA repair genes. Resistance and temozolomide.

REFERÊNCIAS

Agnihotori S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. Arch Immunol Ther. 2013 Feb;61(1):25-41.

Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. Trends Mol Med. 2011 Jun;17(6):301-12.

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. Cell Cycle. 2007 Oct 1;6(19):2344-7. Epub 2007 Jul 18.

Bartek J, Mistrik M, Bartkova J. Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. Nat Struct Mol Biol. 2012 Jan5;19(1):5-7. doi: 10.1038/nsmb.2220.

Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A, Chamberlain MC, Silber JR. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by *Base Excision Repair* mediates glioblastoma resistance to temozolomide. Front Oncol. 2012 Nov;2:176. DOI: 10.3389/fonc.2012.00176.

Buch K, Peters T, Nawroth T, Sänger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - a comparative study. Radiat Oncol 2012 Jan;7:1. DOI: 10.1186/1748-717X-7-1.

Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. Cell. 2001 Apr;105(1):149-60.

Denysenko T et al. Glioblastoma câncer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. Cell Biochem Funct. 2010 Jun;28:343-51. DOI: 10.1002/cbf.1666.

Eich M, Roos WP, Nikolova T, Kaina B. Contribution of *ATM* and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. Mol Cancer Ther. 2013 Nov;12(11):2529-40. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0136.

Hegi ME et al. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005 Mar;352(10):997-1003.

Hoeijmakers, JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature.

2001 May;411(6835):366-74.

Levitus M et al. The DNA helicase *BRIP1* is defective in Fanconi anemia complementation group J. Nat Genet. 2005 Sep;37(9):934-5.

Levran O et al. The BRCA1-interacting helicase *BRIP1* is deficient in Fanconi anemia. Nat Genet. 2005 Sep;37(9):931-3.

Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCJ. Cancer Cell. 2005 Sep;8(3):255-65.

Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

Nadkarni A, Shrivastav M, Mladek AC, Schwingler PM, Grogan PT, Chen J, Sarkaria JN. *ATM* inhibitor KU-55933 increases the TMZ responsiveness of only inherently TMZ sensitive GBM cells. J Neurooncol. 2012 Dec;110(3):349-57. DOI: 10.1007/s11060-012-0979-0.

Peng M, Litman R, Xie J, Sharma S, Brosh RM Jr, Cantor SB. The FANCJ/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. Embo J. 2007 Jul;26(13):3238-49.

Qiu ZK, Shen D, Chen YS, Yang QY, Guo CC, Feng BH, Chen ZP. Enhanced *MGMT* expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. Chin J Cancer. 2013 Aug. DOI: 10.5732/cjc.012.10236

Santivasi WL, Xia F. The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors. Cell Biosci. 2013 Feb;3(1):10.

Skalli O, Wilhelmsson U, Örndahl C, Fekete B, Malmgren K, Rydenhag B, Pekny M. Astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) displays 3 subtypes with unique expression profiles of intermediate filament proteins. Hum Pathol. 2013 Out;44(10): 2081-88.

Sze CI, Su WP, Chiang MF, Lu CY, Chen YA, Chang NS. Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. Front Oncol. 2013 Mar;(3):59.

Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? Antioxid Redox Signal. 2005 Mar;7(3-4):367-84.

Valente V, Teixeira S, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. BMC Mol Biol. 2009 Mar;10:17. DOI: 10.1186/1471-2199-10-17.

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumor stem cells. Nat Rev Cancer. 2006 Jun;(6):425-36. DOI: 10.1038/nrc1889.

Wu Y, Brosh RM Jr. FANCJ helicase operates in the Fanconi Anemia DNA repair pathway and the response to replicational stress. Curr Mol Med. 2009 May;9(4):470-82.

Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. Front Oncol. 2012 Dec;2:186. DOI: 10.3389/fonc.2012.00186

Zheng Z, Ng WL, Zhang X, Olson JJ, Hao C, Curran WJ, Wang Y. RNAi-mediated targeting of noncoding and coding sequences in DNA repair gene messages efficiently radiosensitizes human tumor cells. Cancer Res. 2012 Mar;72(5):1221-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2785.

Recebido em 24 de janeiro de 2014

Aceito em 7 de julho de 2014