

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

**INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS XIAP E SURVIVINA NA
RESISTÊNCIA DE GLIOMAS**

PATRICIA LUCIANA DA COSTA LOPEZ

Orientador: Prof^o Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

**INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS XIAP E SURVIVINA NA
RESISTÊNCIA DE GLIOMAS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
da UFRGS como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Biologia Celular e
Molecular.

PATRICIA LUCIANA DA COSTA LOPEZ

Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, junho de 2012.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências e do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Milênio de Terapia Gênica – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

"Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Este trabalho é dedicado a todos que persistem no aperfeiçoamento das coisas que nos rodeiam. Em especial às três pessoas que me ensinaram isso de diferentes maneiras: à minha mãe, que sempre trabalhou com dedicação, respeito e ética; à minha avó, que sempre teve paciência e determinação; e ao meu pai que enfatizou a importância de fazer o que é certo com alegria, sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof Guido Lenz, por confiar a mim um projeto importante para a construção do laboratório e por proporcionar um ambiente em que a liberdade de pensamento é sempre bem vinda.

À minha mãe que sempre será o meu melhor exemplo de garra, determinação e honestidade. Sou grata por todo suporte ofertado para que eu pudesse “só estudar”.

À minha avó, sempre viva na minha memória, por nunca ter desistido de me ensinar os números e cada letra que eu via na infância.

Ao meu pai, que sempre me superestimou, mas que com um brilho orgulhoso no olhar me inspira sempre a ser alguém melhor.

Ao meu companheiro e incansável incentivador Luciano Breyer Cabistani, pela amizade e o amor que me dedica todos os dias. À família Breyer por me receber com tanto carinho, em especial a Asta, pela acupuntura e conselhos que me mantiveram firme na conclusão desse trabalho.

À família Garra de Águia do Centro Cultural Chinês, em especial ao Shifu Sérgio Queiroz e ao Loushi Fábio Custódio, por me ensinar dentro da filosofia do kung fu “a persistir e a ser humilde e paciente, galgando um a um os degraus do conhecimento”.

Aos meus queridos amigos Tatiana Gonzalez, Carolina Uribe, Lísiane Giorgis, Karina Durigon que não só perdoaram as minhas ausências como fizeram cada minuto de folga valer muito a pena. À minha amiga Karina Nonemacher que nunca entendeu toda a minha dedicação ao doutorado.

À minha grande família Costa, que tentou entender as minhas constantes ausências, em especial ao Vinícius e ao Davi, meus queridos afilhados.

Aos meus colegas de laboratório que me proporcionaram uma vivência de grande crescimento. Agradeço especialmente às Alessandras, à Tamajusuku pela linda amizade que construímos, à Pelegrini por me fazer rir e ainda me apoiar quando tudo parecia ruir. À Lauren, que me ensinou muito sobre biologia celular e concursos. Ao meu amigo mais sem noção, José, pela bueníssima amizade cordobesa. Ao meu grande amigo Eduardo, que praticamente coorientou esse

trabalho e me diverti nos momentos mais difíceis. À agridoce Emilly que enfrentou corajosamente o “desafio” de trabalhar comigo, possibilitando o nascimento de uma grande amizade e admiração. À Pítia por sempre surpreender e alegrar o ambiente de trabalho. Ao Andrew por me aturar nos piores momentos de trabalho e ao Darlan pela colaboração na parte final do projeto, sempre com muita qualidade. À Franciele pela imensa disponibilidade em ajudar sorrindo e à Priscila por manter a ordem em meio ao caos.

Ao Felipe Sassi, Elivira e a Gleice que participaram da construção dessa tese de forma encantadora, trabalhando duro e com excelente qualidade de execução. Mais que isso, construímos uma grande amizade.

Aos super colaboradores Cláudia Andrade e Luís Felipe Ingrassia que trouxeram muito mais que ciência, mas uma incrível postura profissional.

A Prof^a Mara Benfato e ao Prof José Arthur Bogo Chies por compor minha comissão de acompanhamento de forma muito proveitosa.

A Prof^a Fabiana Horn e a todos do laboratório 103, em especial a Nicolle por todo tipo de apoio e gentilezas que um vizinho pode oferecer.

Ao PPGBCM pelas oportunidades oferecidas, em especial a Silvia e o Luciano, que com empenho e simpatia facilitam a realização de muitos trabalhos.

Agradeço a CAPES, ao Instituto Milênio-CNPq e a FAPERGS por todo apoio financeiro fundamental a esse trabalho.

Aos funcionários da UFRGS, em especial aos seguranças que amigavelmente nos deixavam mais tranquilos para trabalhar nos experimentos realizados à noite , finais de semana e feriados.

APRESENTAÇÃO

Esta tese se encontra estruturada da seguinte maneira:

Capítulo I

- Introdução
- Hipótese, Objetivos Gerais e Específicos do trabalho.

Capítulo II

- Sensibilização de gliomas ao silenciamento da proteína XIAP, aceito pelo periódico *Oncology*.

Capítulo III

- Manuscrito: Temozolamida e doxorrubicina, efeitos distintos em células tronco tumorais de glioblastoma humano, a ser submetido ao periódico *Molecular Cancer*.

Capítulo IV

- Doxorrubicina e silenciamento de XIAP e survivina em células tronco tumorais de U87-MG

Capítulo V

- Discussão e interpretação geral dos resultados encontrados.
- Perspectivas geradas pelo trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	18
ABSTRACT	19

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. GLIOMAS	21
a. Epidemiologia	21
b. Características dos glioblastomas	23
c. Tratamentos dos gliomas	24
o Terapia gênica e RNA de interferência	30
d. Origem dos gliomas	31
e. Características moleculares dos gliomas	33
o Via da proteína RB	35
o Via de sinalização da proteína RTK	36
o Via da proteína p53	38
2. MORTE CELULAR	39
a. Apoptose	41
o Via extrínseca	44
o Via intrínseca	45
b. Necrose	46
c. Autofagia	50

d. Catástrofe Mitótica	53
3. SENESCÊNCIA	54
4. FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DE APOPTOSE	60
a. XIAP	65
b. SURVIVINA	70
5. HIPÓTESE	75
6. OBJETIVOS	75
a. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
CAPÍTULO II	
MANUSCRITO I - <i>Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) knock down</i>	77
CAPÍTULO III	
MANUSCRITO II – <i>Temozolomide and Doxorubicin, their different effects on human glioblastoma cancer stem cell</i>	96
CAPÍTULO IV	
o Doxorubicina e silenciamento de XIAP ou survivina em células tronco tumorais de U87-MG	118
CAPÍTULO V	
DISCUSSÃO	131
CONCLUSÕES	141
PERSPECTIVAS	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
ANEXO	176

LISTA DxxE FIGURAS

Figura 1. Taxa de mortalidade entre homens portadores de câncer do SNC nos países da América do Sul.	22
Figura 2. Mandrágora americana (<i>Podophyllum peltatum</i>), contém o princípio ativo de etoposídeo	24
Figura 3. “Maria-sem-vergonha” (<i>Catharanthus roseus</i>), planta que contém o princípio ativo de vincristina.	25
Figura 4. “Teixo-do-pacífico” (<i>Taxus brevifolia</i>), fonte do princípio ativo de taxol.	26
Figura 5. Origem e evolução das células tronco tumoral (CTT).	32
Figura 6. Alterações genéticas frequentes em três vias de sinalizações críticas em gliomas.	34
Figura 7. Via da proteína RB na terapia do câncer.	36
Figura 8. Características morfológicas da morte celular vista por microscopia eletrônica.	40
Figura 9. Via intrínseca e extrínseca de apoptose.	43
Figura 10. A interface entre Apoptose e a Necrose programada.	48
Figura 11. A morte celular pode envolver caspases e autofagia.	51
Figura 12. Marcação de β -Gal em cultura de células humanas.	55
Figura 13. Senescência celular afeta a proliferação de gliomas.	59
Figura 14. <i>Spodoptera frugiperda</i> (lagarta do cartcho), organismos em que a família das proteínas Inibidoras de Apoptose foi primeiramente estudada.	60
Figura 15. <i>Autographa californica</i> , organismo em que a inibição de apoptose por p35 foi observada.	61
Figura 16. Família Inibidora de Apoptoses (IAP) de mamíferos.	62
Figura 17. Mecanismos Regulatórios de IAPs em apoptose.	64
Figura 18. Modelo de inibição diferencial das vias apoptóticas de Fas e Bax pelos fragmentos de XIAP	67
Figura 19. A citoproteção de survivina envolve a via citoplasmática-mitocondrial e cooperação com XIAP.	72
Figura 20. Estrutura em tripla-hélice do complexo de survivina inteiramente representada com fragmentos de INCENP e boralina.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais alvos dos fármacos utilizados nessa tese	28
Tabela 2. Principais características das proteínas membro da família IAP	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP (*ATP-binding cassette transporters*);

AKT – Homóloga Celular ao Oncogene Viral **v-AKT**. Também conhecida como PKB – Proteína cinase B;

Atg - Genes de autofagia (*Autophagy genes*);

APAF1 – Fator apoptótico 1 ativador de protease (*apoptotic protease activating factor 1*);

ARF – Fator 1 de ribosilação do ADP (*ADP-ribosylation factor*);

ARTS - Proteína relacionada à apoptose (*Apoptosis-related protein*);

ATM – Proteína mutada da Ataxia Telangiectasia (*Ataxia Telangiectasia Mutated*);

ATR – Proteína relacionada à ATM e Rad3 (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*);

BAK – Antagonista de morte Bcl-2 (*Bcl-2 antagonist killer*);

BAX – Proteína Bcl-2 associada ao X (*Bcl2-associated X protein*);

BCL2 – Proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell lymphoma protein 2*);

Bcl-xl – Proteína de isoforma longa relacionada a Bcl2 (*Bcl2 related protein, long isoform*);

BCNU – 1,3-bis 2 cloroetil-1-nitrosurea, também conhecida como Carmustina;

Bid – Domínio agonista de morte de interação com BH3 (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*);

BIR – Repetições baculovírus (*Baculoviral IAP repeat*);

Bub1 – *Budding uninhibited by benzimidazoles 1*;

CARD - Domínio de recrutamento de caspases (*Caspase activations recruitment domain*);

CBTRUS – Centro de Registro de Tumores do Cérebro dos Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United States*);

CD133 – Prominina 1 (*Prominin-1, Cluster of differentiation 133*);

CD95 – *Cluster of differentiation 95*. Também chamado de APO-1- antígeno de apoptose 1 (antigen of apoptosis 1);

CDK – Cinase dependente de ciclina (**Cyclin-dependent kinase**);

Chk1 – Cinase de ponto de checagem 1 (**Checkpoint kinase 1**);

c-IAP 1 – IAP celular 1 (**Cellular IAP-1**);

c-IAP 2 - IAP celular 2 (**Cellular IAP-2**);

COMMD1 – Proteína 1 que contém o domínio do metabolismo do cobre (**Copper Metabolism MURR1 Domain-containing Protein 1**);

CPC - Complexo cromossômico de passagem (**Chromosomal passenger complex**);

CTT – Célula tronco tumoral;

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol di-hidro-cloreto (**4',6'-Diamino-2-Phenylindole, Dihydrochloride**);

DAXX – Proteína 6 associada à morte (**Death-associated protein 6**);

DOXO – Doxorrubicina;

DR – Receptores de Morte (**Death Receptor**);

E2F – Fator de Transcrição E2 (**E2F family of DNA-binding transcription factors**)

EGFR – Receptor de fator de crescimento epidermal (**Epidermal growth factor receptor**);

ETOPO – Etoposídeo;

ERBB2 - Homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritoblástica (**Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2**);

FADD – Domínio de morte associado a Fas (**Fas-associated death domain**);

Fas – Ácido graxo sintetase (**Fatty Acid Synthetase**);

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (**Food and Drug Administration**);

GBM – glioblastoma;

GPI – Glicosilfosfatidil inositol (**Glycosylphosphatidylinositol**);

GTP – Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)

H2AX – histona **H2AX**;

hTNF – Fator de necrose tumoral humano (*Human tumor necrosis factor*);

hFAM – FAM humana (*Fat facet in mouse*);

HSP – Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*);

IAP – Proteínas Inibidoras de Apoptose (*Inhibitors of apoptosis protein*);

IBM – Motivo de ligação de IAP (*IAP binding motif*);

IFN – Interferon;

INCENP – Proteína interna de centrômero (*Inner centromere protein*);

JNK – c-Jun N-terminal cinase (*c-Jun N-terminal Kinase*);

KD – knock down;

KLF-4 – (*Kruppel-like factor 4*);

LMP – permeabilização da membrana lisossomal (*Lysosomal membrane permeabilization*);

MDM2 – Minuto duplo murino 2 (*murine double minute 2*);

MDR1 – proteína de resistência a multiplas drogas (*Multidrug resistance protein*). Também conhecido como ABCB1;

MEK – Proteína cinase ativada po mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*);

MMP14 – Matriz metaloproteinase (*matrix metalloprotease-14*);

ML-IAP – IAP de melanomas (*Melanoma IAP*);

MOMP – Permeabilização da membrana mitocondrial externa (*Mitochondrial Outer-Membrane Permeabilization*);

mTOR – Proteína alvo da rapamicina de mamíferos (*mammalian target of rapamycin*);

MTT – Metabolismos mitocondrial;

NAIP – Proteína inibidora de apoptose neuronal (*Neuronal apoptosis-inhibitory protein*);

NF1 - Neurofibromatose-1 (*Neurofibromatosis 1*);

NF- κ B – Fator nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*);

NOXA – Ativador de NADPH (*NADPH oxidase activator*);

NSCM – Meio de célula tronco neural (*Neural Stem Cell Medium*);

Oct4 – Fator de transcrição octâmero-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*);

OMS – Organização Mundial de Saúde;

PARP – Poli ADP-ribose polimerase (*Poly ADP ribose polymerase*);

PDGFRA- Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor receptor*);

PI3K – Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*);

PKA – Proteína cinase A (*Protein Kinase A*);

PLK1 – *Polo-like kinase-1*;

PTEN – Proteína Homóloga Fosfatase/tensina Deletada do Cromossomo 10 (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*);

PTPC – Complexo poro de transição de permeabilidade (*Permeability transition pore complex*);

PUMA – p53-modulador desregulado de apoptose (*p53 upregulated modulator of apoptosis*);

RAS – Também chamada de p21;

RB – Proteína retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*);

RIP – Serina-treonina cinase (*Receptor-interacting protein*);

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*);

RTK – Receptores de tirose cinase (*Receptor of tyrosin kinase*);

shRNAi – short-hairpin RNA interference;

SMAC/DIABLO – Segundo ativador mitocôndrial de caspase / Proteína de ligação-IAP direta com baixo pI (**S**econd **m**itochondria-derived **a**ctivator of **c**aspases)/ (**D**irect **I**AP-**b**inding protein with **l**ow PI);

SNC – Sistema Nervoso Central;

SOX2 – Sex determining region Y -**box 2**;

STAT5 – Transdutor de sinal ativador de transcrição (**S**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription);

TMZ – Temozolamida;

TNF - Fator de necrose tumoral (**T**umor **n**ecrosis **f**actor);

TRADD –Domínio de morte associado a TNFR1 (**TNFR1**- **a**ssociated **d**eath **d**omain);

TRAIL – Ligante indutor de apoptoses relacionado a TNF (**TNF**-**r**elated **a**poptosis **i**nducing **l**igand);

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial (**V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor);

VINC – Vincristina;

XAF – Fator associado à XIAP 1 (**XIAP** **a**ssociated **f**actor **1**);

XLP – Síndrome linfoproliferativa ligada ao X (**X**-linked **l**ymphoproliferative **s**ndrome);

XIAP – Proteína inibidora de apoptose ligada ao X (**X**-Linked inhibitor of **a**poptosis **p**rotein);

RESUMO

Glioblastomas (GBM) são tumores de difícil tratamento pela alta resistência a quimioterápicos. Entre os GBMs a presença de células tronco tumorais (CTT) foi associado a um pior prognóstico para os pacientes, indicando que essas células podem contribuir para resistência aos tratamentos. Além disso, proteínas como XIAP e survivina (inibidoras de apoptose) estão altamente expressas em GBMs e, devido a sua capacidade de inibir caspases, podem participar de mecanismos de resistência a apoptose. Nesse trabalho foi estudado o silenciamento estável de XIAP ou survivina e seus efeitos na sensibilização de GBMs U87-MG a fármacos. Para isso, utilizou-se RNAs de interferência *short hairpin* e vetores lentivirais para o silenciamento estável de XIAP ou survivina combinados a diversos fármacos. Entre os fármacos testados, doxorrubicina (doxo 1 μ M) e vincristina (vinc) (100 nM) apresentaram os melhores resultados na sensibilização dos GBMs silenciados através da indução de apoptose e senescência. Doxo elevou a expressão das proteínas p53 e γ H2Ax, indicando dano ao DNA de forma acentuada nas linhagens silenciadas. Vinc apresentou indução de vários tipos de morte, com taxas de apoptose, necrose e alterações no aspecto nuclear que indicaram catástrofe mitótica. O efeito crônico dos tratamentos em 48 horas com doxo, temozolamida e vinc foi avaliado em ensaio clonogênico sem que as diferenças de sensibilização fossem mantidas. Com isso, sugere-se que nas células silenciadas foram selecionados mecanismos de resistência após os tratamentos. A formação de tumor-esferas nas culturas de U87-MG, um indicativo da presença de CTTs, analisada após cinco dias de tratamento com doses reduzidas de doxo e tmz mostrou que doxo 1 nM selecionou as CTT e induziu senescência nas células diferenciadas, enquanto que doxo 10 nM e tmz 5 μ M reduziram o número de CTTs. Esse estudo mostrou que a inibição de XIAP e survivina sensibiliza GBMs a determinados fármacos principalmente através da indução de apoptose e senescência pela sinalização de p53. A avaliação do efeito em longo prazo do tratamento agudo com os fármacos estudados deve ser considerada como indicativo de que células silenciadas para XIAP e survivina podem desenvolver mecanismos que revertem o efeito do silenciamento. Além disso, dependendo da dose, doxo pode interferir na participação de CTTs na resistência de GBMs.

ABSTRACT

Glioblastomas (GBM) are characterized by high resistance to chemotherapy and difficult treatment. The cancer stem cells in GBMs were associated to poor prognosis for patient, and may contribute to enhanced resistance. Moreover, inhibitors of apoptosis proteins as XIAP and survivin are high expressed in GBM and due to their ability to caspase inhibition can be involved in apoptosis resistance mechanisms. In this work we study the stable silencing of XIAP or survivin and its effects in U87-MG sensitization to chemotherapy drugs. For this, short hairpin RNA delivery through lentiviral vectors were used to stable knocking down XIAP or survivin combined with drugs. Among the drugs tested, XIAP KD cells were more sensitive to doxorubicin (doxo) 1 μ M and vincristine (vinc) 100 nM when compared to WT or control KD cells, presenting more apoptosis and senescence induction. This suggests that KD of XIAP sensitizes glioma cells to specific drugs. Doxo enhanced expression of activated proteins p53 and H2Ax, indicating enhanced DNA damage in KD cells compared to WT cells. Vinc induced diverse kind of death in KD cells, with apoptosis, necrosis and significant changes in nuclear appearance as a clue of mitotic catastrophe. The chronic effect after 48 hours treatments of temozolomide, doxo and vinc evaluated by clonogenic assay did not present the sensitization due to XIAP KD. These suggest a selection of resistance mechanism after treatments in KD cells. The tumor-spheres formation in U87-MG cultures, an indicative of CSC, was analyzed after 5 days treatments with low doses of doxo and tmz. Doxo 1 nM selects CSC and induces senescence in differentiated cells. Doxo 10 nM and tmz 5 μ M reduced the quantity of CSC. The results show XIAP and survivin KD sensitizes GBMs to some drugs, mainly by apoptosis and senescence by p53 signaling. The long term analysis of acute treatment should be considered as indicative that KD cells may develop reversible mechanisms to the combined effect of silencing XIAP and treating with chemotherapeutic drugs. Moreover, depending of the dose, doxo can affect CSC participation on GBM resistance.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1. Gliomas

Glioblastomas multiformes (GBM) são os tumores primários mais frequentes e agressivos do sistema nervoso central (SNC). Um paciente com o diagnóstico de glioblastoma multiforme (GBM), classificado como grau IV pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda que com todas as alternativas terapêuticas, tem sobrevida mediana de 10 a 14 meses após o diagnóstico (Van Meir, 2010). A severidade desse prognóstico provém de diversos fatores que tornam GBMs um tipo de tumor complexo e de difícil tratamento. Enquanto outros tecidos tumorais podem ter partes removidas sem a perda funcional ou com pequena perda funcional do órgão, o mesmo nem sempre pode ser aplicado aos tumores do sistema nervoso central.

1.a. Epidemiologia

Os dados sobre a incidência de GBMs são escassos na literatura, sendo na maioria das vezes descritos para a população norte-americana, onde são bastante freqüentes (CBTRUS, 2011). O perfil mais comum dos pacientes com gliomas norte-americanos é formado por homens, com idade em torno de sessenta anos, brancos, casados e que passaram por cirurgias e radioterapia como terapia (Johnson, 2011). Desde que a combinação de radioterapia e temozolamida (TMZ) foi proposta, em torno do ano de 2005, a sobrevida aumentou em apenas dois meses. Isso indica que os tratamentos oferecidos atualmente vêm melhorando pouco ao longo dos anos, com o agravante do número crescente de pacientes (Lawrence, 2011). Krakstad (2010) comenta ainda

que a baixa incidência de 6-7/100000 novos casos coloca os GBMs entre “doenças órfãs”, no sentido de que não chamam muita atenção da indústria farmacêutica.

Nos registros do sítio eletrônico da *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS) é possível encontrar dados demonstrando a incidência de tumores do SNC no Brasil nos últimos anos. De 1996 a 2008 foi registrado um aumento de 2000 para aproximadamente 3500 casos de morte por câncer no SNC, sendo os homens os mais atingidos. Comparando os dados registrados de países da América do Sul, o Brasil apresenta a dados crescentes e uma maior incidência de câncer de SNC (figura 1), tendo registrado 3590 mortes por esse

tipo de câncer em 2008

(CBTRUS, 2011). De

acordo com a Consulta

Pública 30/2010 no sítio

eletrônico do Governo

Federal do Brasil, os

tumores cerebrais

malignos representam

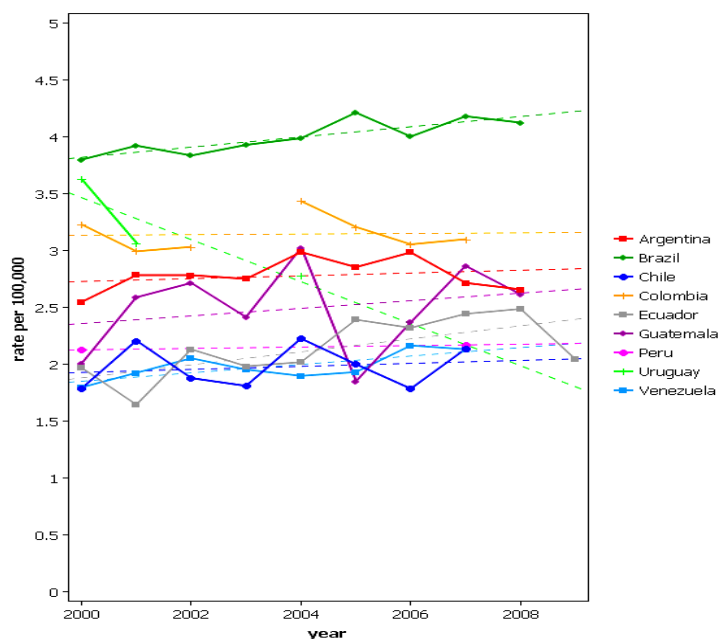
apenas 2% dos cânceres

que ocorrem no país, mas

que apresentam as

maiores taxas de

mortalidade em adultos (2010).



International Agency for Research on Cancer (IARC) - 28.12.2011

Figura 1. Taxa de mortalidade entre homens portadores de câncer do SNC nos países da América do Sul (CBTRUS, 2011).

1.b. Características dos GBMs

As principais características dos GBMs são: invasibilidade, alta tumorigenicidade, resistência a quimioterapia e recidiva após tratamento radioterápico. Desvendar características moleculares da complexidade tumoral é fundamental para o desenvolvimento de diagnósticos diferenciais e tratamentos que considerem a heterogeneidade celular e as diferentes vias de sensibilização a morte celular.

Os GBMs são divididos pela análise histopatológica em diferentes graus de malignidade pela OMS, sendo os astrocitomas de grau III e glioblastomas de grau IV considerados os tipos mais agressivos. Entre os gliomas malignos, 60 a 70% são GBMs, 10 a 15% são astrocitomas anaplasicos, 10% oligodendromas anaplasicos (Louis, 2006; CBTRUS, 2011). O diagnóstico clinicopatológico é normalmente baseado em estudos histológicos que possibilitam observar alterações da morfologia nuclear, atividade mitótica, a vascularização e ocorrência de necrose. No entanto, a expressão de genes específicos já é considerada para avaliação preditiva da agressividade tumoral frente aos tratamentos (Van Meir, 2010).

A histopatologia dos GBMs é bastante heterogênea e isso, além de indicar uma complexidade de microambiente tumoral, também justifica em grande parte a resistência da massa tumoral. Se pensarmos que nessa heterogeneidade celular há também uma heterogeneidade molecular (genética e epigenética) e, portanto diferentes níveis de envolvimento de proteínas da tumorigênese permitindo invasibilidade e resistência a diversos fármacos. Esse quadro complexo ilustra

bem a principal dificuldade do desenvolvimento de novas terapias, e estratégias que buscam atingir alvos comuns a essa diversidade celular ou seguir buscando novos alvos.

1.c. Tratamentos dos GBMs

Atualmente, os tratamentos de GBMs são baseados na ressecção cirúrgica do tumor, seguido por radioterapia concomitante ao tratamento com TMZ. Embora a radioterapia venha se aperfeiçoando para atingir um tumor de características morfológicas irregulares (Stieber, 2007), a combinação com um fármaco adjuvante, especialmente TMZ, foi o principal avanço nos últimos anos (Stupp, 2009). A TMZ é um fármaco aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) desde 1999 com uma expectativa de aproximadamente 20% de resposta dos pacientes com astrocitoma, e posteriormente, em 2005 indicado para pacientes com GBMs (Yung, 1999; Cohen, 2005). O fármaco é um agente alquilante administrado via oral capaz de metilar preferencialmente as posições N-7 ou O-6 dos resíduos de guanina da molécula de DNA, gerando danos.

Implantes de Carmustina (BCNU) (comercialmente encontrado como GLIADEL® WAFER, Eisai Inc.) foram propostos para o local da ressecção cirúrgica, seguidos pela radioterapia e tratamento com TMZ com boas perspectivas de aumento de sobrevida para os pacientes (Westphal, 2003). No



Figura 2. Mandrágora americana (*Podophyllum peltatum*), contém o princípio ativo de etoposídeo. Adaptado de Mann (2002).

entanto, alguns estudos chamaram a atenção para uma possível toxicidade de BCNU sistêmico em baixas doses e curta meia-vida (Westphal, 2003). De acordo com Pan (2008), a combinação BCNU e TMZ não traz efeitos tóxicos e mesmo com a aprovação do FDA, muitos oncologistas ainda tem receio de seguir com uso de implantes de BCNU. A toxicidade induzida pela combinação de TMZ e BCNU é bastante controversa e foi colocada em dúvida especialmente porque ambos os fármacos interferem na molécula de DNA (ainda que por mecanismos diferentes – Tabela 1) (Zhang, 2006). Além disso, foi demonstrado em estudos recentes que possivelmente não tenham o efeito proposto inicialmente (Noel, 2011) e poderiam igualmente conferir resistência aos GBMs (Reithmeier, 2010).

Os tratamentos de “segunda linha” para GBM ganham espaço frente à severidade ainda presente no prognóstico dos pacientes. A combinação de radioterapia-TMZ embora muito respeitada, nem de perto resolve a problemática da maioria dos pacientes com GBM. Outros fármacos com alvos similares a TMZ como etoposídeo (ETOPO) (VP-16, Eposin, Etophos, Vepesid) e doxorrubicina (DOXO) (Adryamicin®) que tem como alvo a inibição de enzimas *Topoisomerases* são também consideradas como estratégia terapêutica (Martínez, 2005). ETOPO foi extraído de uma planta nativa da América do Norte chamada de mandrágora americana (*Podophyllum peltatum*, figura 2), e atua na inibição da replicação através da interação com *Topoisomerases II* (Montecucco, 2007).



Figura 3. “Maria-sem-vergonha” (*Catharanthus roseus*), planta que contém o princípio ativo de vincristina. Adaptado de Mann (2002).

A molécula de DOXO (tabela 1) atua como intercalante de DNA e conseqüentemente, inibe a atividade da enzima *Topoisomerase I* na transcrição e ao estabilizar o complexo *Topoisomerase II* e o DNA, acaba inibindo também a replicação. DOXO é mais frequentemente utilizado para tratamentos de câncer de mama, tumores sólidos da infância, sarcomas e linfomas agressivos; desenvolve toxicidade aos tecidos sadios, levando especialmente a cardiomiopatias crônicas quando administrado de forma sistêmica. As doses usadas nos pacientes variam de um pico de 5 µM até a estabilidade no plasma entre 25 e 250 nM, o que chama atenção para que se tenha cautela com estudos que utilizam doses acima de 1 µM (Minotti, 2004). DOXO (Adryamicin®) é uma antraciclina extraída da bactéria *Streptomyces peucetius* desde a década de 1960, que mesmo não sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, vem sendo considerada para tratamento de gliomas combinada a outros fármacos (Almubarak, 2008) através de estratégias como injeções diretas na região tumoral (Lesniak, 2005), associação com lipossomas (Kikuchi, 2008; Chen, 2011; Qin, 2011) e o desenvolvimento de nanopartículas (Steininger, 2004; Verreault, 2011; Wohlfart, 2011). Os esforços para o desenvolvimento de novas formas de administração de DOXO buscam a redução ou eliminação dos efeitos sistêmicos, além de permitir que as doses maiores, estudadas na literatura, sejam factíveis dentro da prática clínica.



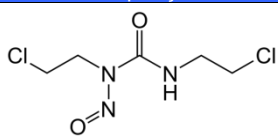
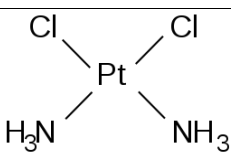
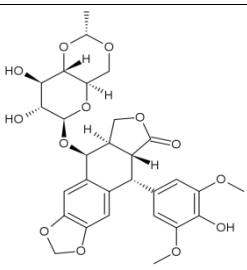
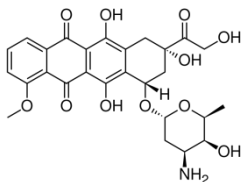
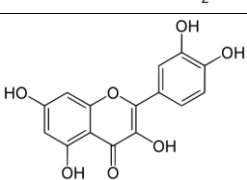
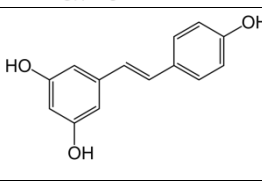
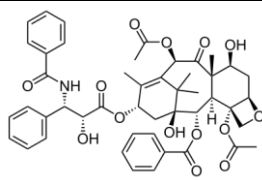
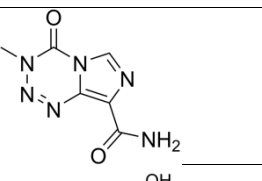
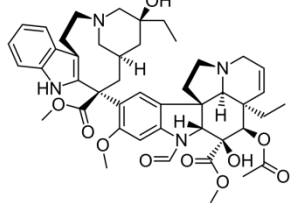
Figura 4. “Teixo-do-pacífico” (*Taxus brevifolia*), fonte do princípio ativo de taxol. Adaptado de Mann (2002).

Outra estratégia considerada na terapia de gliomas e outros tipos de câncer é o uso de inibidores de microtúbulos, como Taxol e Vincristina (VINC), capazes de alterar o citoesqueleto e principalmente a segregação das cromátides irmãs durante a mitose. VINC é um alcalóide, inibidor de microtúbulos, encontrado em plantas vincas ou como são popularmente conhecidas no Brasil, “maria-sem-vergonha”(*Catharanthus roseus*) (figura 3). Os estudos de VINC já apontam um bom potencial terapêutico, possivelmente induzindo eventos como catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu, 2008).

Apesar disso, a combinação de VINC com procarbazina e lomustina não teve efeito diferencial quando comparado com TMZ em pacientes com gliomas recorrentes (Brada 2010).

O mesmo efeito é atribuído ao Taxol (Paclitaxel®) que é também um alcalóide extraído da casca de uma árvore conífera da América do Norte, popularmente chamada de teixo-do-Pacífico (*Taxus brevifolia*, figura 4).

Tabela 1. Principais alvos dos fármacos utilizados nessa tese.

Fármaco	Composição	Alvos	Referências
Carmustina /BCNU / Gliadel® 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea		Agente alquilante de DNA	(Reithmeier 2010)
Cisplatina cis-diaminodicloroplatina (II)		Dano ao DNA através da formação de <i>crosslinks</i> ; inibe a transcrição de RNA; induz parada do ciclo celular (G2); induz apoptose.	(Sorenson 1990; Mello 1995; Li 2011)
Etoposídeo 4'-demethyl-epipodophyllotoxin 9-[4,6-O-(R)-ethylidene-beta-D-glucopyranoside], 4' -(dihydrogen phosphate)		Ligação a <i>Topoisomerase II</i> , induzindo quebras duplas no DNA.	(Sevim 2011)
Doxorrubicina Adryamicin®		Agente intercalante, alquilante, Inibidor de <i>Topoisomerase II</i> , e indutor de crosslinks; ativa ligação de p53 ao DNA; induz parada no ciclo celular (G2); induz apoptose; induz senescência celular.	(Rebbaa 2003; Minotti 2004; Kurata 2008)
Quercetina 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon		Ação antioxidante; promove ativação da proteína p53 e paradas no ciclo celular.	(Tanigawa 2008)
Resveratrol trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene		Atua em diversos alvos de indução de apoptose; capaz de ligar-se a DNA/RNA; proteína de resistência a múltiplos fármacos; <i>Topoisomerase II</i> ; receptor de estrógeno; tubulina; PDE4, entre outros alvos; inibição de crescimento celular.	(Harikumar 2008; Shakibaei 2009; Park 2012)
Taxol / Paclitaxel®		Bloqueio da mitose através da estabilização dos microtúbulos; induz dano ao DNA e apoptose; parada do ciclo celular (G2/M).	(Wang 1999; Wertz 2011)
Temozolamida / Temodar®		Dano ao DNA através da metilação de sítios nucleofílicos (efeito reversível pela enzima <i>O</i> ⁶ - <i>metilguanina-DNA</i>) Induz apoptose e senescência;	(Gunther 2003; Cohen 2005)
Vincristina / Oncovin®		Bloqueio da mitose através dos microtúbulos; induz apoptose.	(Shinwari 2008)

Fármacos como erlotinib (Tarceva®), imatinib (Gleevec®) e enzastaurin atuam em alvos protéicos, mais especificamente na inibição do fator de crescimento epidermal (EGFR), de sítios tirosina cinase, e da sinalização de (VEGF) respectivamente.

Nos últimos anos, a inovação para a estratégia de inibição de angiogênese para tratamento de GBM recorrentes foi o uso de um anticorpo monoclonal recombinante para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o bevacizumab (Avastin®) (Pope, 2006; Almubarak, 2008). Esse é o mais novo fármaco autorizado pelo FDA para tratamento de GBM desde o ano de 2009 (Cohen, 2009), o qual atua em células endoteliais na inibição da formação de novos vasos e conseqüentemente reduzindo o aporte de oxigênio para o tumor. Apesar disso, a interação de bevacizumab e a barreira hematoencefálica ainda não é bem elucidada, e alguns estudos demonstram que pode reduzir o efeito de outros fármacos (Thompson, 2011).

Além de novos fármacos, agentes adjuvantes a terapias convencionais são propostos. Compostos como resveratrol e quercetina estão sendo propostos como agentes adjuvantes da terapia de gliomas (embora a principal contribuição sejam como agentes preventivos e não terapêuticos). O resveratrol é um polifenol encontrado na uva, no vinho tinto, frutas vermelhas, amendoim e nozes, entre outras fontes (Careri, 2003). Vários estudos já demonstraram que o resveratrol tem potencial de inibir o crescimento celular (Kundu, 2008). Já o flavonóide quercetina, pode ser encontrado na cebola, brócolis, tomate, alface, chá verde, maçã, vinho tinto, suco de uva, azeite de oliva, fruta vermelhas, alcaparras entre outras fontes (Hertog, 1992; Hertog, 1993). Estudos com quercetina demonstram

que o composto é capaz de induzir a morte celular por necrose e apoptose, inclusive gliomas, ainda por mecanismos desconhecidos (Hertog, 1993). Foi demonstrado que a combinação de resveratrol e quercetina pode induzir senescência em linhagens de GBMs de rato, indicando que o uso desses compostos pode auxiliar na terapia do câncer (Zamin, 2009).

Ainda que a combinação radioterapia-TMZ seja considerada o caminho mais “seguro” no tratamento de GBMs, e bevacizumab seja uma boa perspectiva terapêutica, é preciso ressaltar que esse tipo de tumor é composto por células diferentes e que a chance de resistência persiste em diferentes tratamentos. Isso intensifica a necessidade de compreensão dos diversos mecanismos moleculares de resistência que possam estar presentes no tecido tumoral de GBMs.

Terapia Gênica e RNA de Interferência

Os fármacos usados na quimioterapia do câncer podem interferir em muitas proteínas e fatores ao mesmo tempo, sendo difícil definir muitas vezes o alvo atingido e os possíveis efeitos negativos. O uso da terapia gênica pode atingir diretamente proteínas alvos e auxiliar na compreensão da maquinaria de resistência à morte celular. A modulação gênica de tumores possibilita a ativação de supressores tumorais e repressão de oncogenes através do uso de vetores de expressão e RNAs de interferência. Essa metodologia contribui também para o estudo de alvos terapêuticos que merecem atenção para o desenvolvimento de moléculas inibidoras e novos quimioterápicos.

Um estudo *in vivo* de gliomas usando vetor lentiviral para a inibição de Bcl-2 (proteína inibidora de apoptose) com shRNAi combinada com a expressão de TRAIL (ativador da resposta apoptótica) trouxe boas perspectivas a essa

metodologia (Kock, 2007). Recentemente outro estudo mostrou que o silenciamento usando retrovírus e RNAi contra PLK1 (*polo-like kinase-1*) e MMP14 (*matrix metalloprotease-14*) pôde silenciar alvos de uma linhagem humana de fibrosarcoma humano, levando a apoptose, redução da invasão e do volume do tumor induzido por essas células *in vivo* (Schaser, 2011).

A inibição de XIAP (*X-linked Inhibitor of apoptosis*) através de RNAi e moléculas inibidoras (Schimmer, 2004) conseguiu induzir apoptose e sensibilização de tumor gástrico *in vivo* (Tong, 2005). O uso de vetor adenoviral contendo antisenso de XIAP foi capaz de suprimir o crescimento de GBMs em camundongos (Naumann, 2007). O efeito crônico do silenciamento de IAPs na resistência de gliomas a diferentes quimioterápicos ainda não está claro, visto que os mecanismos de morte celular são complexos e altamente regulados.

1.d. Origem dos GBMs

A formação dos GBMs tem como origem as células tronco neurais ou precursoras de oligodendrócitos, que sofreram mutações ou outras alterações epigenéticas (Hadjipanayis, 2009; Liu, 2011). Entre tumores sólidos, como gliomas, existem evidências de uma organização hierárquica sustentada por uma subpopulação que renova o repertório de células tumorais (tanto tumorigênica quanto não-tumorigênica) (Visvader 2008).

Em muitos tipos de tumores, inclusive GBM, são encontradas as células tronco tumorais (CTT), que apresentam algumas características de células tronco. Se as características tronco das CTTs são uma manutenção das características tronco das células de origem ou se elas se originaram de uma reprogramação celular ainda está em aberto (Hadjipanayis, 2009). Marcadores de células tronco

neurais, como CD133 (Promini-1) (Singh 2004; Gentaio 2006), NANOG (Brandner, 2010) e OCT4 (Du, 2009), identificados na população de GBMs sustentam as hipóteses da presença de células com características tronco (Venere, 2011). As CTTs quando isoladas de tumores malignos são capazes de formar novos tumores em camundongos (Liu, 2011), acentuando a ideia de que células com características tronco mantêm tumores e podem ser responsáveis pela recidiva dos mesmos. Isto reforça uma das características fundamentais das CTTs, que é a capacidade de formar novos tumores, tanto em modelos in vivo de crescimento tumoral, quanto após um tratamento, numa recidiva.

A progressão tumoral é marcada por estímulos oncogênicos que atingem as células ao longo do desenvolvimento e levam a alterações de expressão de diversas proteínas como apresentado na figura 5.

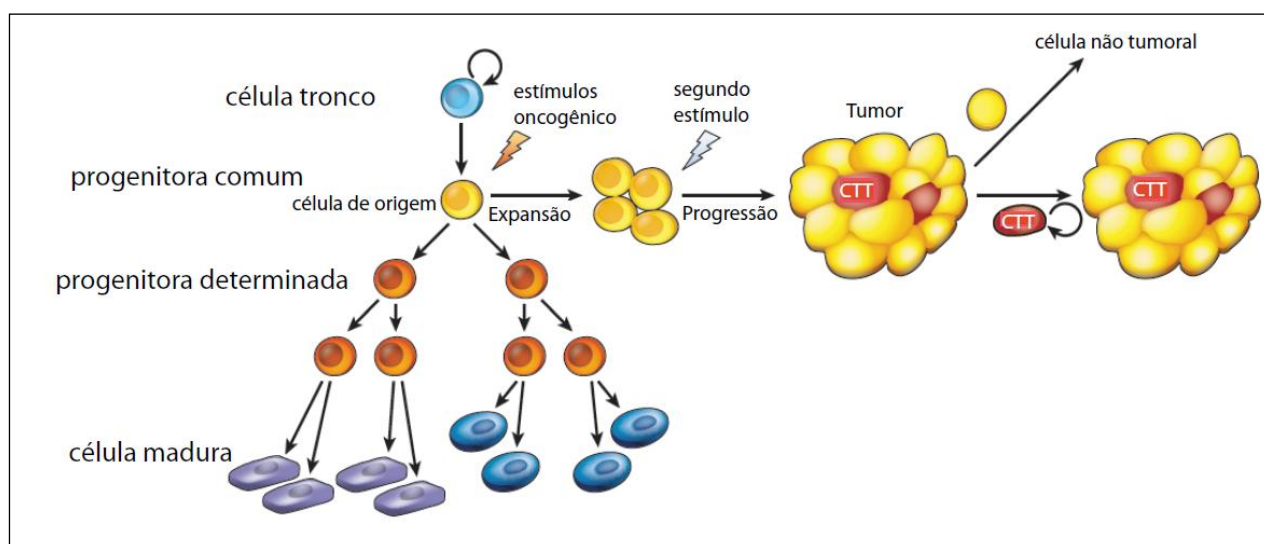


Figura 5. Origem e evolução das células tronco tumoral (CTT). A hierarquia celular normal compreende CTTs que progressivamente geram células progenitoras e células progenitoras determinadas, obtendo-se todos os tipos de células maduras que constituem um tecido. Embora a célula de origem de um tumor particular possa ser uma célula precursora inicial como a progenitora, o acúmulo de mutações epigenéticas em uma célula dentro de uma população

alterada (e expandida) durante a progressão neoplásica pode resultar no surgimento de células tronco tumorais (CTT). Nesse modelo, apenas as CTTs são capazes de sustentar a tumorigênese. Entretanto, a célula de origem na qual a tumorigênese está iniciada, pode ser distinta das CTT que propagam o tumor. Adaptado de Visvander (2011).

Uma característica importante das CTTs é a capacidade aumentada de reparo de danos ao DNA, mecanismo que pode conferir resistência ao tratamento radioterápico (Bao, 2006). A resistência a quimioterápicos que não tem DNA como alvo principalmente pode também ser atribuído a alta expressão de transportadores ABC (ATP-binding cassette transporters), capazes de bombear para fora os fármacos do interior da célula (Frank 2005, Elliott, 2009). A presença de CTTs nos GBMs faz com que as novas terapias considerem as características dessas células para melhorar a eficácia dos tratamentos e evitar a recorrência desses tumores (Venere, 2011).

1.e. Características moleculares dos GBMs

As principais alterações na expressão gênica e protéica dos gliomas, assim como em outros tipos tumorais, estão relacionadas à superexpressão ou ativação de oncogenes e o silenciamento de genes supressores de tumor. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas depende da boa compreensão do envolvimento das vias de proliferação celular, ciclo celular, apoptose e dano ao DNA. Um estudo com 34 linhagens celulares de GBMs identificou as proteínas p53, p16 e proteína homóloga fosfatase/ tensina deletada do cromossomo 10 (PTEN) como as alterações mais freqüentes (Ishii, 1999). É importante lembrar a dificuldade de avaliar o efeito das vias estudadas devido a heterogeneidade celular de tumores como GBMs. As principais alterações genéticas encontradas entre os GBMs envolvem pelo menos três vias: a via da proteína de

retinoblastoma (Rb); a via do receptor tirosina cinase (RTK), RAS e fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K); via da proteína p53 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Cerami, 2010; Fan, 2010) (figura 6).

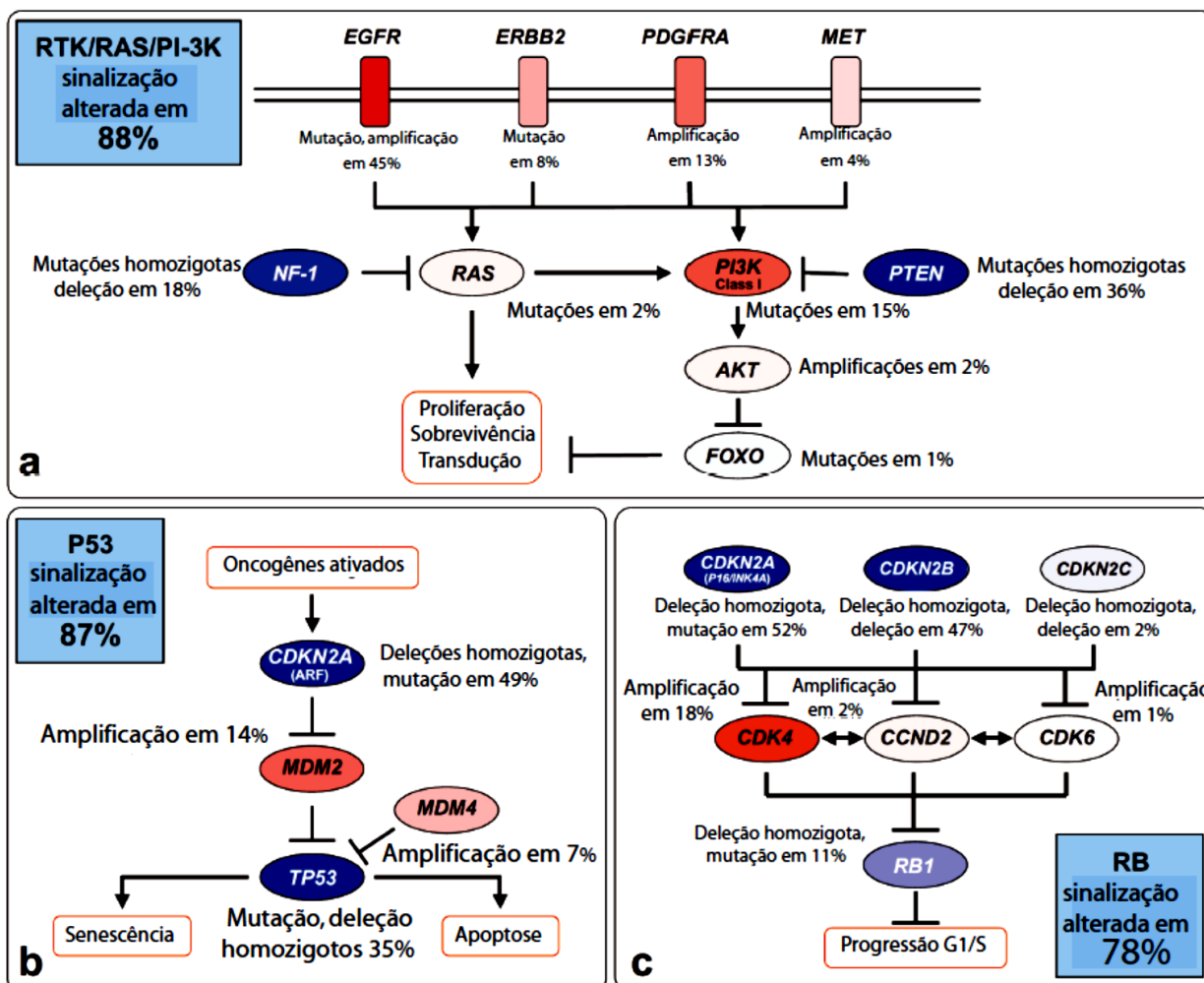


Figura 6. Alterações genéticas frequentes em três vias de sinalizações críticas em gliomas. Nas vias de sinalização de RTK/RAS/PI-3K (a), p53(b), RB(c), vermelho indica alteração de ativações gênicas, sendo os mais frequentes indicados pelo vermelho mais intenso. Do contrário, a cor azul indica a alterações inativadoras, sendo mais frequentes em tons mais escuros. Para cada componente alterado consta a natureza da alteração e percentagens de tumores afetados. Nas caixas em azul se encontram as percentagens finais de alterações em gliomas com no mínimo um componente conhecido da correspondente via. Adaptado de Cancer Genome Atlas (2008).

Via da Proteína RB

A via de RB é formada por cinco famílias de proteínas que tem como principal função regular a proliferação celular através da ativação e inibição de fatores que promovem ou suprimem o crescimento celular. Entre as famílias envolvidas na via de RB estão inibidores de cinase dependente de ciclina (CDKI); ciclinas D; cinases dependentes de ciclina (CDK); fatores de transcrição E2F; e a família de RB. A desregulação da via RB ocorre principalmente por alterações das proteínas RB, p16 Ink4a e ciclina D1 (Knudsen, 2010).

RB é fundamental para o controle da progressão do ciclo celular e diferenciação celular pela regulação da passagem da fase G1 para S, quando ocorre a síntese do DNA. A fosforilação de RB realizado pelo complexo CDK4/ciclina-D1 impede a ligação de RB e E2F, permitindo que E2F atue como fator de transcrição de proteínas importantes para início da fase S do ciclo celular. A proteína p16INK4a ao impedir a formação do complexo CDK4/ciclina-D1, inibe a fosforilação de pRB, impedindo a progressão do ciclo celular para fase S (Khidr, 2006; Knudsen, 2010). Entre os GBMs, alterações da via de RB são observadas por frequentes deleções de RB e p16ink4a, além de ampliações de CDK4, como visto na figura 7 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

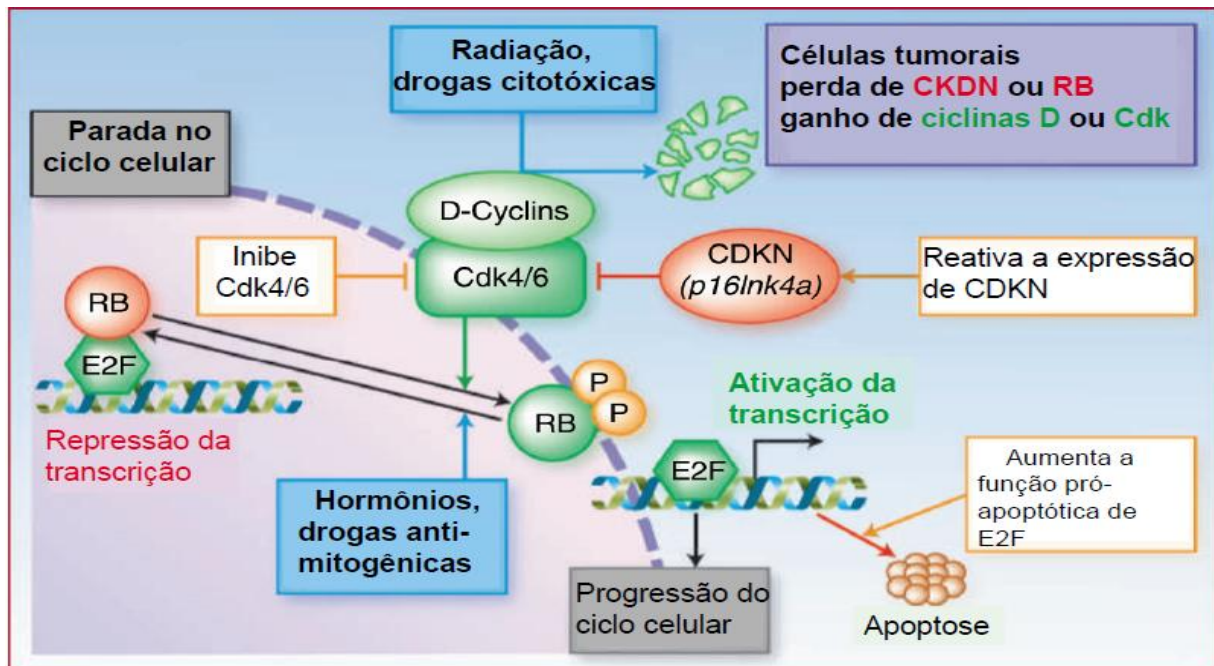


Figura 7. Via da proteína RB na terapia do câncer. Alterações genéticas e epigenéticas da via da RB são constantemente presentes em gliomas, sendo as principais alterações resumidas na caixa lilás no canto superior direito da figura. O estado da via de RB afeta a resposta celular à radiação e fármacos genotóxicos, que causam paradas no ciclo celular pela degradação de ciclina-D1 e a consequente defosforilação de RB. O estado da via de RB também altera a resposta celular a hormônios e outras estratégias terapêuticas de bloqueio da sinalização de mitose. Falhas na via da RB causam desregulação da atividade de E2F, que estimula a expressão gênica para a transição de G1/S e apoptose. As estratégias terapêuticas em potencial que agem diretamente nessa via estão apresentados em caixas em laranja, e incluem a reativação da expressão de p16INK4a nos casos em que o gene está silenciado, mas não mutado; a inibição da atividade cinase de Cdk4/6, e o aumento de apoptose dependente de E2F. Adaptado de Knudsen (2010).

Via de Sinalização de Proteína RTK

A família dos receptores tirosina cinase em humanos é formada por aproximadamente 58 receptores de superfície celular que possuem funções-chaves de eventos celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência, metabolismo, migração e controle do ciclo celular (Robinson, 2000). Os membros

da família RTK compartilham a presença de uma hélice transmembrana com domínio de ligação na região extracelular e uma proteína tirosina cinase na região citoplasmática (Lemmon, 2010). Em geral, a ativação acontece pela dimerização dos receptores que fosforilam um ou mais substratos vizinhos, estimulando uma cascata de sinalização como as vias de PI3K e Ras (figura 7).

Os receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), receptor homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritoblástica (ERBB2) e o receptor do fator de transcrição mesenquimal-epitelial (MET) são alterados em 88% dos GBMs, havendo maior destaque aos EGFRs (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) (figura 7). Muitos membros da família de receptores de EGFs (EGFRs) estão freqüentemente alterados nos GBMs, entre eles, ERBB2 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Esses receptores RTK influenciam vias de transdução de sinal, proliferação e sobrevivência da célula. Entre essas vias, se destacam as vias de RAS e PI3K.

RAS é uma GTPase e um dos primeiros oncogenes humanos descritos, alterados em 30% dos tumores (Van Meir 2009), mas encontrados com mutação em apenas 3% dos GBMs. No entanto, o regulador negativo de RAS, neurofibromatose 1 (NF1) aparece deletado em 18% dos GBM, desta forma levando a uma ativação da via da RAS (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). A complexidade da influência de RAS atinge além das vias de progressão do ciclo celular, a motilidade do citoesqueleto celular, transdução de sinais, apoptose, as junções celulares, endocitose, o transporte nuclear de cálcio, o tráfego de membranas e formação de vesículas (Malumbres, 2003).

A via da PI3K pode ser ativada pela RAS ativada (ligada a GTP) e estimular com a complexa via da proteína Akt que implica proliferação e sobrevivência celular atuando em diversos alvos. PI3K é inibida por PTEN, mas em GBMs essa interação está desregulada por mutações em PI3K ou ainda por alterações que levam à inativação da própria PTEN (Stokoe, 2009; Van Meir, 2009)

Via da Proteína p53

A proteína p53 é um conhecido supressor tumoral com diversas alterações descrita para a maioria dos tumores, sendo alterado em 87% GBMs (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Entre muitas funções atribuídas ao gene está a de fator de transcrição de uma série de genes envolvido em vias anti-proliferativas, pró-apoptóticas, anti-angiogênicas e ser um importante regulador do ciclo celular (através da regulação de p21, inibidor de CDKs). No citoplasma, a p53 interage com proteínas mitocondriais de forma determinante da via intrínseca de apoptose. Mesmo interligando tantas vias, a denominação de “guardião do genoma” é referida como a mais importante função de p53. Essa atribuição é dada devido à importância de p53 em possibilitar paradas de verificação e correção de danos ao DNA ao longo ciclo celular e ainda induzir a apoptose caso esses danos não sejam reparados (Van Meir, 2009).

A função de p53 pode ser regulada pela elevada atividade de MDM2, que promove a degradação da p53 através da sua ubiquitinação no citoplasma. P53 é também fator de transcrição de MDM2, que se encontra mutada em 14% dos GBMs, contribuindo a favor da progressão tumoral (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Modificações de perda de função em PTEN podem

“proteger” p53 da ubiquitinação de MDM2. Isso porque PTEN inibe PI3K/Akt, responsáveis pela translocação de MDM2 ao núcleo, impedindo a degradação de MDM2 no citoplasma. Muitos GBMs têm PTEN mutada ou com alguma alteração, fazendo com que mesmo havendo p53 normal, uma maior presença de MDM2 pode reduzir os níveis de p53 nuclear e conseqüentemente, inibir as funções de fator de transcrição de genes pró-apoptóticos e a resposta apoptótica a danos a DNA (Mayo, 2002).

A sinalização de p53 participa da via apoptótica pela influência na transcrição de proteínas como BCL2. No citoplasma, p53 atinge a via mitocondrial de apoptose ao formar complexos com BCLXL e BCL2, além de induzir a transcrição de PUMA, Noxa e BAX (Fridman, 2003).

2. Morte Celular

A compreensão e o combate ao câncer dependem dos estudos que caracterizam a morte celular. Uma célula normal possui diversos mecanismos que priorizam uma morte celular sem prejuízo ao organismo. *In vivo*, a morte de uma célula pode ser ativada por células do sistema imune em resposta a uma infecção viral, por exemplo. Desde a década de 1960 se procura caracterizar mecanismos de morte celular, que inicialmente foram descritos baseados apenas na morfologia celular observada no microscópio (figura 8). Kroemer (2005) definiram morte celular como a perda irreversível da integridade da membrana plasmática (Kroemer, 2005), mas ainda hoje, através de análises moleculares, os tipos de morte são descritos de acordo com a via ou família de proteínas envolvidas. Métodos bioquímicos se sobressaem à análise morfológica pela possibilidade de

quantificarmos a participação de proteínas chaves do processo de morte. No entanto, a análise bioquímica/molecular requer o uso de vários marcadores para evitar falsos indícios de morte celular. Entre as principais análises realizadas para detecção de morte celular estão a ativação de caspases, a exposição de fosfatidil serina (indica a exposição da parte interna a membrana plasmática), a geração de espécies reativas de oxigênio, a integridade da membrana mitocondrial e o estado de proteínas relacionadas com a sobrevivência celular como p53. O conjunto de métodos permite diferenciar os principais tipos de mortes estudados: a apoptose, a necrose, a catástrofe mitótica, a morte celular autofágica e mais recentemente descrita, a necroptosis (Galluzzi, 2011).

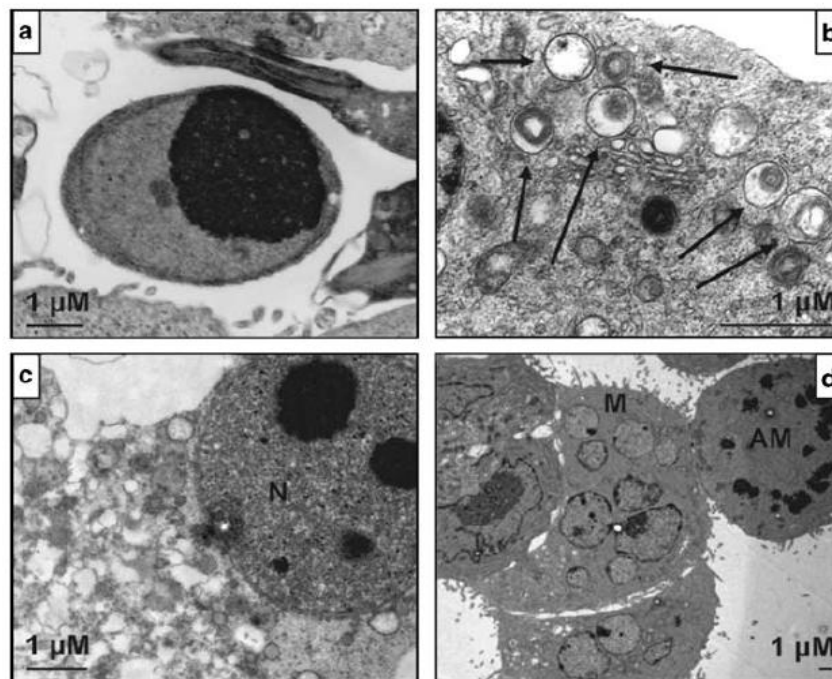


Figura 8. Características morfológicas da morte celular vista por microscopia eletrônica. (a) Células de câncer de pulmão não-pequenas células (H1975) em apoptose, induzida pelo inibidor do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Observe o encolhimento da célula e a completa condensação nuclear (picnose). (b) Células de câncer epitelial humano (HeLa) tratado com toxina taspargina que afeta o retículo endoplasmático. As células nesse caso

sofrem autofagia devido ao acúmulo massivo de vacúolos citoplasmáticos de dupla membrana (seta) contendo organelas ou parte do citosol. (c) Células de carcinoma de colon humano (HCT116) respondendo ao estímulo necrótico. O núcleo se mantém intacto, com nucléolos bem definidos, enquanto o citoplasma e a membrana plasmática se encontram degradados. (d) Células HCT116 tratadas com substâncias que alteram a dinâmica dos microtúbulos. As células apresentam características de catástrofe mitótica como a multipolaridade mitótica alterada (AM), assim como o fenômeno de multinucleação (M). A barra de escala representa 1 µm. Adaptado de Galluzzi (2007).

2.a. Apoptose

Apoptose é um mecanismo de morte altamente difundido entre os organismos para manutenção da homeostase, defesa imune e desenvolvimento, permitindo maior complexidade na evolução dos organismos biológicos (Wei, 2008). O termo “apoptose” vem do grego (apo=separação/ ptosis= queda), pois inicialmente foi relacionado à queda das folhas vegetais. Há muitos anos se estuda a apoptose celular, que primeiramente era analisada através da morfologia celular (Kerr, 1972; Cotter, 2009) e hoje é caracterizada através de diversos marcadores moleculares.

Morfologicamente a apoptose se caracteriza por alterações nucleares como a condensação e fragmentação da cromatina, pequenas modificações nas organelas, encolhimento de toda a célula, formação de bolhas de membrana (*blebbing*) e formação de corpos apoptóticos contendo material citoplasmático. É importante salientar que esses eventos ocorrem sem a perda da integridade da membrana plasmática (Kerr, 1972). Os corpos apoptóticos são englobados e digeridos por macrófagos sem que ocorra a produção de citosinas, permitindo que o processo inflamatório não seja ativado (Elmore, 2007).

As diversas vias de sinalização de apoptose, consideradas sofisticadas e complexas, requerem gasto de ATP. Duas vias principais regem a apoptose, uma

via extrínseca e uma via intrínseca que divergem na forma de ativação de apoptose, mas caminham na mesma direção final. A cascata de ativação de caspases é o sinal primordial de toda a via apoptótica - embora já se tenha registrado apoptose independente de caspases, em que a fragmentação do DNA tenha sido mediada de maneira alternativa (Joza, 2001). As caspases executoras 3, 6 e 7 clivam uma série de substratos, como PARP, resultando na degradação do citoesqueleto e de proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de receptores recrutadores de células fagocitárias e degradação do DNA (Elmore, 2007) (figura 9).

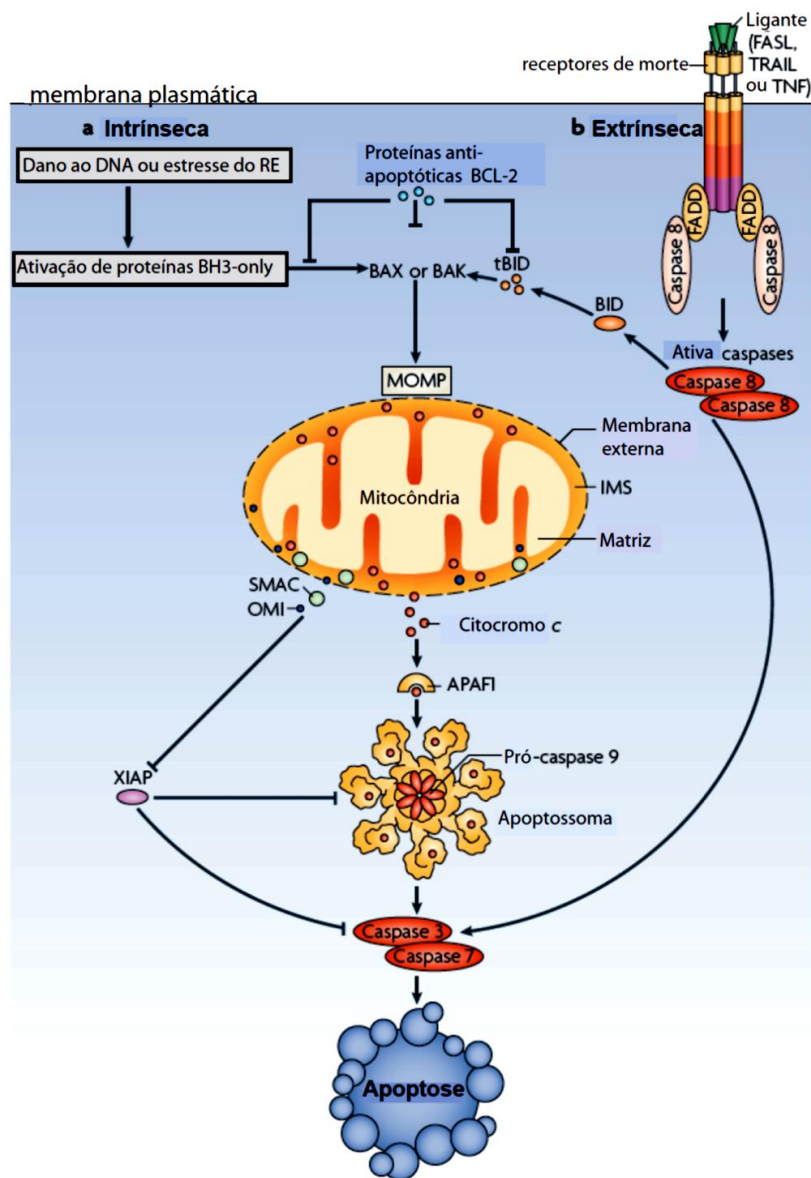


Figura 9. Via intrínseca e extrínseca de apoptose. (a) O estímulo apoptótico intrínseco, como o dano ao DNA ou ao retículo endoplasmático (RE), ativam BCL-2 que ativa BAX e BAK, permeabilizando a membrana mitocondrial externa (MOMP - mitochondrial outer membrane permeabilization). A liberação de várias proteínas mitocondriais promove a ativação de caspases e apoptose. Citocromo c se liga APAF1, induzindo a oligomerização e assim a formação do apoptossoma que recruta e ativa caspase 9. Essa ativação ativa caspases executoras 3 e 7, levando a apoptose. A liberação de SMAC/DIABLO e OMI/HTRA2 da mitocôndria neutraliza a inibição de caspases realizadas por XIAP. (b) A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, levando ao recrutamento de moléculas adaptadoras como FADD e então caspase 8 que cliva diretamente caspase 3 e 7, levando a apoptose. A ligação entre as vias intrínsecas e

extrínsecas ocorre através da clivagem de caspase 8 e ativação de BID. Alterado de Tait (2010).

Via extrínseca

A via extrínseca é marcada pela ativação de sinais externos à célula, havendo a participação de vários receptores transmembrana que propagam o sinal para o citoplasma. Os chamados receptores de morte (*death receptors-DR*) são membros da família TNFR (*Tumor Necrosis Factors Receptors*) que se caracterizam pela ativação através de ligantes específicos que ativam a sinalização apoptótica.

Entre os principais e melhor caracterizados DR estão o FasR (Ácido graxo sintase – *Fatty acid synthetase Receptor*; CD95 – *Cluster of Differentiation 95*; APO-1 – *Apoptosis antigen 1*), TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 1*), TRAIL-R2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 2*) e TNFR1 (*Tumor Necrosis Factors Receptor 1*), que divergem de acordo com os respectivos ligantes: CD95 (FasL – Fas Ligante); TRAIL/APO2L (APO2 Ligante) e hTNF (human TNF)-(Mahmood, 2010; Galluzzi, 2011). Esses receptores possuem subdomínios ricos em cisteínas que interagem com ligantes específicos na região extracelular e, na região intracelular (DR), interagem com adaptadores FADD (*Fas Associated Death Domain*), TRADD (*TNFR-associated Death Domain*) ou DAXX (*Death Domains Associated protein*) (Elmore, 2007; Mahmood, 2010). Em questão de segundos após a ativação do receptor, a cascata de caspases é ativada através da dimerização de caspase 8, que cliva e ativa as caspase 3 e 7 para efetivação de apoptose em algumas horas (Mahmood, 2010; Tait, 2010) (figura 9).

Via Intrínseca

A via intrínseca de apoptose não é mediada por receptores; tem como cerne a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria ou MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). Os gatilhos dessa via não são tão específicos como os da via extrínseca e possui um grande número de fatores que podem ser negativos ou positivos. Negativos se remetem à ausência do estímulo de fatores de crescimento, hormônios e citocinas que inibem a apoptose. Entre os estímulos positivos estão a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (Elmore, 2007). A MOMP é regulada por uma série de proteínas da família Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), responsáveis pela formação de poros através da dimerização de proteínas como BAK e BAX.

A liberação de citocromo c é a principal consequência da MOMP, que juntamente com SMAC/DIABLO, OMI/ HTRA2 ativam uma cascata de clivagem de caspases (executoras de apoptose) (Tait 2010). Livre no citosol, citocromo se associa a APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) para formação do apoptossomo, um complexo que recruta, dimeriza e ativa caspase-9 e que consequentemente ativa as caspases 3 e 7 (Tait, 2010; Galluzzi, 2011). SMAC/DIABLO e OMI / HTRA2 no citosol também são importantes para promover a apoptose inibindo a família das IAPs, em especial, XIAP, capaz de inibir caspase 9 (Schimmer, 2004) (figura 9).

Uma das principais razões para a MOMP é a sinalização gerada por danos ao DNA. Membros da família Bcl-2 podem ser regulados por vias de sobrevivência relacionadas ao ciclo celular e à resposta a danos no DNA, como a via da p53 (descrita anteriormente) (Hemann, 2006). A proteína p53 regula

positivamente a transcrição das proteínas pró-apoptóticas BH3 e Bax (Miyashita, 1995), além de NOXA e PUMA (Oda 2000; Jeffers 2003) que também participam da MOMP. Pode ainda regular negativamente a expressão dos genes da família das IAPs, como survivina (Mirza, 2002), e antagonizar anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-XL (Hemann, 2006).

Em GBMs muitas das proteínas relacionadas à via apoptótica se encontram deletada, mutadas, desreguladas pela ação de outras proteínas e ou pela regulação transcricional. Os GBMs primários são caracterizados pela amplificação de EGFR e HDM2 (*human homologue of murine mdm2*), inativação de PTEN (Gilbertson, 2006), alterações em p53, além do aumento de função das IAPs entre muitas outras alterações capazes de reprimir a apoptose. As estratégias terapêuticas em desenvolvimento para GBMs buscam a reestruturação dessas vias a fim de reduzir a resistência a apoptose frente aos diversos quimioterápicos.

2.b Necrose

Por muito tempo se considerou necrose como uma morte falha e acidental, algo que não era nem apoptose, nem autofagia. Embora se enfatize os aspectos negativos da necrose, nos casos em que a célula sofre infecção viral e bacteriana a necrose pode trazer benefícios ao organismo. Isso porque a necrose o sistema alerta o sistema imune, enquanto a apoptose é considerada uma morte silenciosa (Festjens, 2006; Golstein, 2006).

As células podem sofrer necrose devido a um estresse extremo com intensidade variável de acordo com o tipo celular. Estresse oxidativo, altas temperaturas, contato com toxinas e choques mecânicos podem levar a célula a

necrose (Syntichaki, 2003). O extravasamento do citoplasma faz com que a célula libere fatores que podem ativar a resposta do sistema imune inato e adaptativo, levando a um processo inflamatório (Festjens, 2006).

Morfologicamente o aspecto da célula necrótica apresenta citoplasma translúcido, organelas túrgidas, alterações nucleares (dilatação da membrana nuclear e condensação da cromatina em disposições irregulares) e aumento de volume que promovem principalmente a ruptura da membrana plasmática (Kroemer, 2005) (figura 9).

As características moleculares da necrose ainda não foram tão bem definidas como as de apoptose. Isso é importante porque essa morte independente de caspases pode contribuir para erradicação de algumas células tumorais que freqüentemente perdem a função apoptótica devido ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (como XIAP, IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-xL), ou o acúmulo de mutações em proteínas pró-apoptóticas (como Bax e p53) (Fesik, 2005; Festjens, 2006).

Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm demonstrando que a necrose pode ser um processo regulável em que alguns marcadores já foram identificados. O termo “necroptosis” foi dado a um tipo de morte não acidental em que há inibição de caspase e indução de morte não-apoptótica com características necróticas. De acordo com Kroemer (2005), a necroptosis é especialmente dependente de atividade cinase serina/treonina de RIP1 (*receptor-interacting protein*) (Galluzzi, 2008), RIP3, inibidores de caspases, ubiquitinas E3 ligase, enzimas desubiquitinadoras, polimerase poli(ADP)ribose (PARP), espécies reativas de oxigênio (ROS), reações bioenergéticas, envolvimento de membros da família

Bcl-2, hidrolases citosólicas, além da permeabilização da membrana plasmática e lisossomal (Vandenabeele, 2010; Galluzzi, 2008) (figura 10).

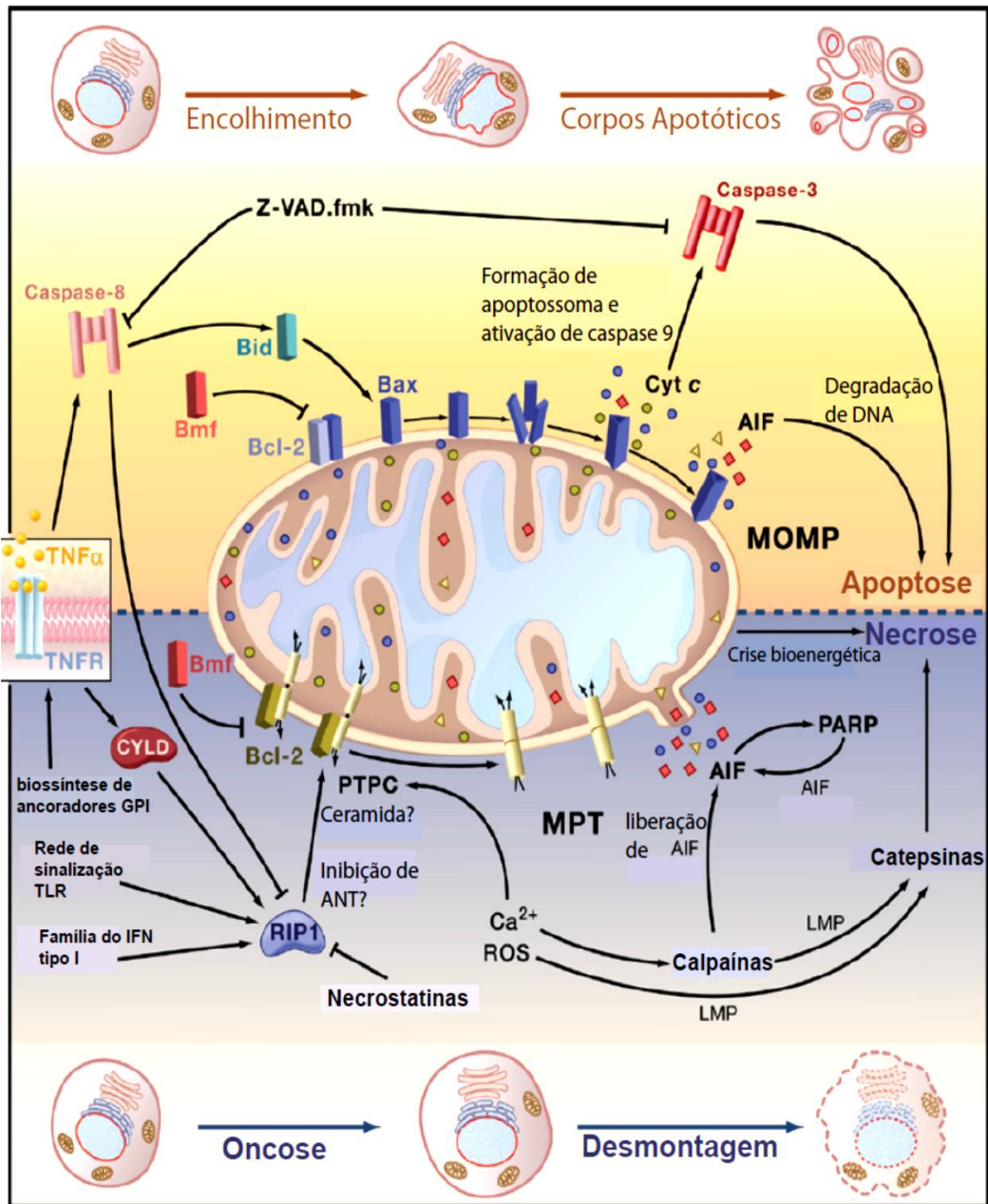


Figura 10. A interface entre Apoptose e a Necrose programada. A necrose programada, também chamada por necroptose estudada por Hitomi e col., é centralizada pela ativação da proteína RIP1 que pode desencadear esse processo em células murinas de fibrosarcoma L929 pela ligação a TNFR ou

inibição de caspases. Em células de fibroblasto murinas NIH 3T3, a ativação de TNFR estimula a via extrínseca de apoptose, dependente de caspase 8. Tanto apoptose quanto necroptose podem preferencialmente envolver a permeabilização mitocondrial (MOMP). Abreviações: AIF (fator de indução de apoptose - *apoptosis inducing factors*); ANT (adenina nucleotídeo translocase - *adenine nucleotide translocase*); Cyt c (citocromo c); GPI (glicosil fosfatidil inositol-*glycosylphosphatidylinositol*); IFN (interferon); LMP (permeabilização da membrana lisossomal -*lysosomal membrane permeabilization*); PTPC (complexo poro de transição de permeabilidade - *permeability transition pore complex*); ROS, (espécies reativas de oxigênio - *reactive oxygen species*); TLR (receptores do tipo Toll -*Toll-like receptor*); TNF α (fator de necrose tumoral α - *tumor necrosis factor α*); TNFR (receptor do fator de necrose tumoral- *tumor necrosis factor receptor*); Z-VAD, Z-Val-Ala-Asp OMe fluoromethylketone. Adaptado de Galluzzi (2008).

Embora as vias de necrose e apoptoses sejam bastante estudadas, outros mecanismos intermediários ou híbridos das vias apoptóticas e necróticas já foram propostos. Essas novas nomenclaturas para morte celular trazem à tona o grau de complexidade dessas vias. Embora nos facilite classificar o processo de morte de uma célula, é preciso ter muita cautela, especialmente em estudos que envolvem tumores primários e linhagens celulares. Isso porque essas células freqüentemente acumulam diversas mutações (muitas vezes não identificadas pela dificuldade de monitoramento do que ocorre ao longo das passagens celulares), tornando muito complexo prever o real status da célula.

2.c Autofagia

O termo autofagia vem do grego (auto= próprio ; fagia= comer) que para a citologia representa a degradação fisiológica em massa dos componentes celulares (organelas e proteínas) para reciclagem de componentes celulares, degradação de componentes velhos ou danificados, ou em resposta a estresse celular. Esse é um processo dinâmico, altamente conservado e regulado geneticamente (especialmente pela família das proteínas Atg – *autophagy genes*) que pode ser ativado em situações de privação de nutrientes celulares, privação de oxigênio e ação de patógenos, entre outras situações anômalas do cenário tumoral. Três tipos de autofagia já foram descritas, que diferenciam de acordo com as funções fisiológicas e o endereçamento da carga a ser degradada nos autofagossomos: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia, e macroautofagia (mais estudada e denominada a partir daqui apenas como autofagia) (Levine, 2008; Jiang, 2009).

No processo autofágico é determinante a formação de vesículas de membrana dupla (cuja origem ainda é incerta) denominadas vacúolos autofágicos ou autofagossomos, que se fusionam com lisossomos para gerar a estrutura funcional, o autofagolisossomo. Essa estrutura permite a degradação e reciclagem de componentes celulares em um ambiente ácido contendo hidrolases lisossomais (Kroemer, 2005). Por degradar componentes celulares defeituosos e também por produzir ATP, autofagia contribui para a sobrevivência celular em condições adversas.

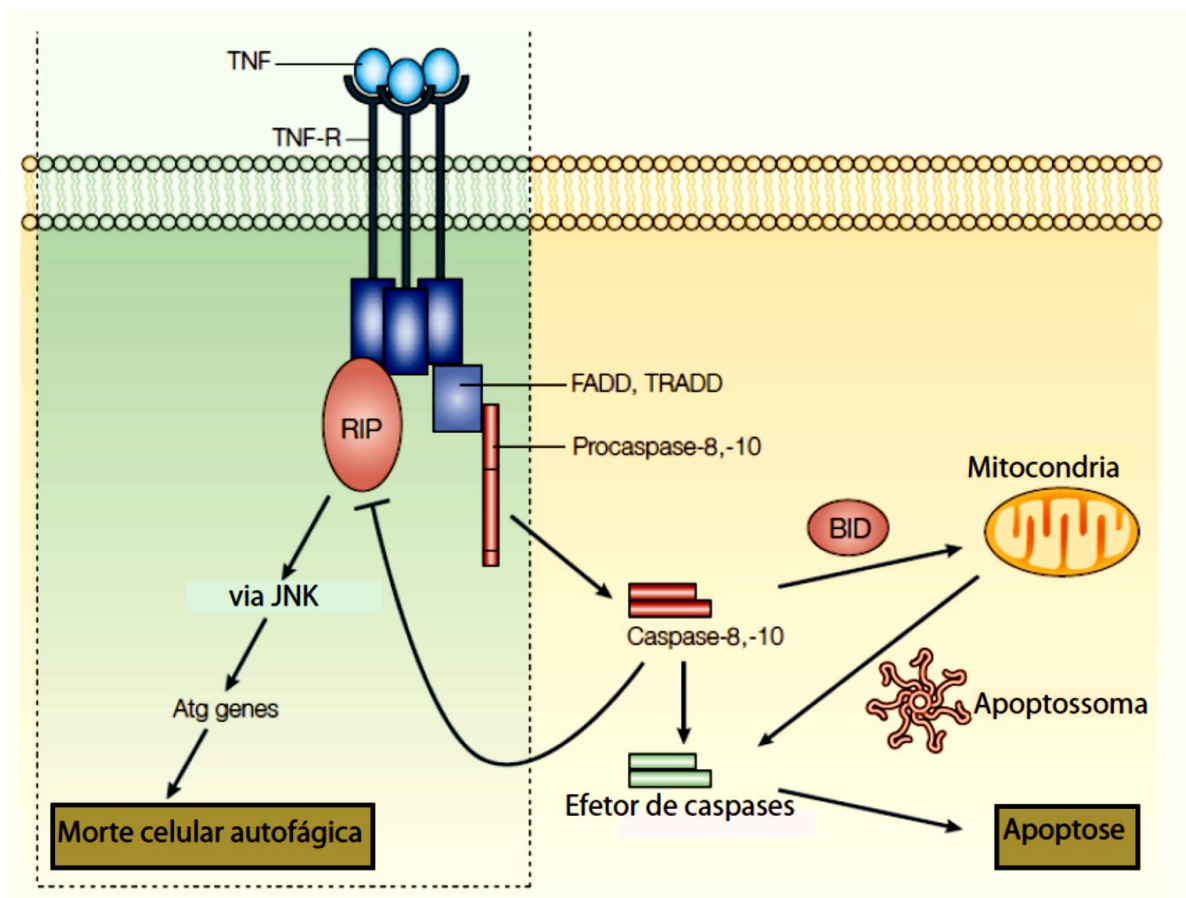


Figura 11. A morte celular pode envolver caspases e autofagia. A ativação de receptores como TNFR podem recrutar RIP e pro-caspase 8 e 10 mediado por TRADD (domínio associado a TNFR) e FADD (domínio associado a Fas) para formar a complexa sinalização dos receptores de morte. A proximidade de caspase 8 e 10 leva a ativação das via mitocondrial envolvendo a família BCL2, como BID, apoptossoma ou a ativação de efetores de caspases e apoptose. Se caspase 8 for inibida, RIP, JNK (Jun N-terminal cinase) e genes Atg regulam a morte celular autófaga. Adaptado de Baehrecke (2005).

No entanto, autofagia em excesso pode levar à morte celular (chamada morte autófaga por alguns autores), de forma ainda não bem descrita (Levine 2005). A ativação de receptores de morte como TNF podem ativar a sinalização de morte com ou sem a ativação de caspases. O receptor de TNF ativado interage com RIP que ativa a via de JNK e componentes da família Atg, podendo

levar à morte autofágica. Por outro lado, se caspase 8 for ativada, RIP é inibida e a morte apoptótica ocorre (Baehrecke, 2005) (figura 11).

Normalmente, o receptor de insulina ativa PI3K, e esse estimula a via de Akt. A autofagia pode ser reprimida pela via de PI3K, que pode ser influenciado pela inibição de PTEN na interação de PI3K e Akt. Quando Akt está ativada pode inibir apoptose e a autofagia através da proteína mTOR. Esta é determinante para iniciar a formação dos autofagossomos pela interação de membros da família Atg (Baehrecke, 2005).

Além disso, beclina-1 é um importante regulador da formação de autofagossomos e da regulação de apoptose pela interação física com Bcl2. Beclina-1 tem baixa expressão em tumores malignos e está associada ao maior risco de metástase tumoral, sugerindo que o processo autofágico possa atuar como um supressor tumoral, incluindo em gliomas (Jiang, 2009). A alta expressão de beclin-1 em tumores está diretamente relacionada com a sobrevivência dos pacientes (Miracco, 2007).

A autofagia em células tumorais tem um papel bastante discutido. A indução de morte autofágica por quimioterápicos como TMZ e Rapamicina (fármacos clássicos do tratamento de gliomas) chamou a atenção para autofagia como mais um mecanismo antitumoral, além da já descrita apoptose (Jiang, 2009). Resveratrol, um polifenol citotóxico para células de gliomas *in vitro*, também pode induzir autofagia e apoptose quando a autofagia está inibida (Filippi-Chiela, 2011). Isso indica que as vias apoptótica e autofágica podem estar muito próximas na condição tumoral, tornando a autofagia desejável na terapia de tumores altamente resistentes a apoptose. No entanto a autofagia pode ser

também combatida, pois é importante para resistência de tumores por possibilitar que a célula resista em condições de baixa concentração de nutrientes e hipóxia (Levine, 2005).

2.d Catástrofe Mitótica

O termo “catástrofe mitótica”, já foi bastante controverso na literatura. Já foi considerado um tipo de morte que acontece na mitose (Vakifahmetoglu, 2008), morte devido a falhas na mitose (especialmente em paradas de checagem), ou nem mesmo ser um tipo de morte, mas uma condição supressora de tumor que já estava determinada antes da mitose que pode culminar em apoptose ou senescência (Castedo, 2004; Vakifahmetoglu, 2008; Galluzzi, 2011). O principal sinal de catástrofe mitótica é a condição alterada do núcleo como multinucleações e micronucleações, que ainda se assemelham com núcleos apoptóticos e necróticos (figura 8). A diferença então precisaria ser definida pela seqüência de eventos acompanhadas por vídeo-microscopias e “molecularmente” pelas vias de resposta a danos ao DNA como p53, caspase 2 (Vakifahmetoglu-Norberg, 2010) e p73.

Entre as causas da catástrofe mitótica está o estresse gerado por agentes indutores de danos ao DNA como a radiação ionizante, quimioterápicos, inibidores de microtúbulos (perturbadores da formação adequada do fuso mitótico) e inibidores dos pontos de checagem do ciclo celular (Vakifahmetoglu, 2008).

3. Senescência Celular

Quando foram realizados os primeiros cultivos de células somáticas *in vitro* na década de 1960, observou-se que a proliferação celular apresentava um limite (Hayflick, 1965). O termo “senescência” (do latim, *senex*) indica envelhecimento e está relacionado a células que sofreram perda irreversível da capacidade de se dividir. As perdas graduais da divisão celular, mesmo em condições ótimas para o crescimento, mantinham as células com metabolismo reduzido e indiferente ao estímulo de mitógenos (Dimri, 1995).

Em culturas celulares, se observa nas células senescentes significativas alterações morfológicas, como tamanho avantajado, achatado e multinucleado (Ewald, 2010) (figura 12). Atualmente, poucos marcadores específicos têm sido usados para identificação de senescência dentro de uma população de células: atividade enzimática e fluorescente β -galactosidase ácida (Udono, 2012), lipofuscina (Kurz, 2007) e, mais recentemente, detecção de focus de heterocromatina – incluindo a detecção de metilação de histonas e a fosforilação de H2AX (Ewald, 2010; Lawless, 2010).

Esse aparente estado de torpor seria um mecanismo de defesa do organismo para impedir o crescimento descontrolado de células que potencialmente se tornassem um tumor. Outra explicação para a senescência celular estaria na questão do envelhecimento das células que já teriam a maquinaria de reparo deteriorada. Assim, as principais características do fenótipo de uma célula senescente são a parada irreversível do ciclo celular; a resistência à apoptose e as alterações na expressão gênica (Campisi, 2007).

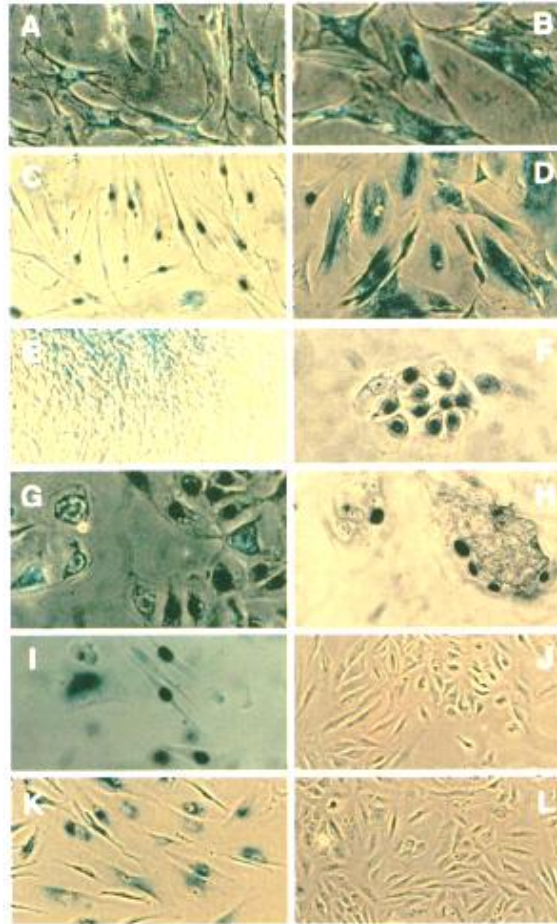


Figura 12. Marcação de β -Gal em cultura de células humanas. A coloração azul indica regiões positivas para atividade de β -Gal. Em A e B as fotos representam a linhagem WI-38 com poucas passagens (A), senescente (B), e pré-senescente em alta confluência (E). HCA2 em baixo número de passagens (C) e senescente (D). Baixas passagens de NHEK (queratinócitos epidermais humanos - *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) (F), meia passagem (G), primeiras passagens (H). Células CMJ com 10 passagens após receber cromossomo 1 (I). Células IDH4 (J), após 17 dias (K), e após 20 dias (L). Adaptado de Dimri (1995).

Avaliando o ciclo celular de uma célula senescente é possível perceber uma estagnação na fase de G1, mantendo a expressão de muitos genes (Ewald, 2010). Essa parada no ciclo celular é mantida por p16INK4a, um inibidor de CDK4 e CDK6, e de p19ARF que regula p53 através da inativação de MDM2. O interessante é que tanto p16INK4a quanto ARF são proteínas pouco expressas

em células jovens e em células tumorais, onde apresentam mutações inibitórias ou deleções (Kim, 2006; Collado, 2007). Assim, células senescentes apresentam alta expressão destes CDKIs, p16INK4a, p21 e p27. Essas mesmas proteínas quando superexpressas em células normais induzem senescência (Campisi 2005; Ewald 2010).

Proteínas oncogênicas como Raf, MEK, Akt, E2F1/3, mos, PTEN, NF1, Stat5, KLF-4, Runx (Lleonart, 2009) e Ras (Serrano, 1997), embora sejam freqüentemente encontradas em maior quantidade em diversos tumores, quando superexpressas em células não cancerosas podem induzir senescência (Gorgoulis, 2010).

Muitos fatores podem induzir senescência, entre os principais estão os encurtamentos dos telômeros (característicos do processo de envelhecimento ou senescência replicativa), danos ao DNA (por radiação ionizante e quimioterápicos alquilantes de DNA), perturbação da cromatina (por quimioterápicos inibidores de microtúbulos), estress oxidativo e indução de oncogenes (Campisi, 2007).

O encurtamento dos telômeros leva a senescência replicativa através da sinalização de dano ao DNA, mas esse processo pode ser revertido pela contínua expressão de telomerase, permitindo a imortalização de células em cultura (Bodnar, 1998). A atividade de telomerase é detectada em 90% dos tumores malignos acentuando o caráter proliferativo e fazendo dessa enzima mais um alvo dentro da terapia do câncer (Lleonart, 2009).

As proteínas p53 e Rb atuam como importantes reguladores do destino da célula, inclusive para promover senescência. Como já foi dito anteriormente, p53 auxilia na remoção de danos ao DNA (comuns em células senis), definindo se a

célula entra em apoptose ou em senescência. Respostas a danos ao DNA podem ocorrer através do recrutamento ATM/ATR que levam a fosforilação de H2AX, apto assim para reunir fatores de checagem de danos e de reparos de DNA. H2AX fosforilada pode ainda promover a fosforilação de Chk1 e Chk2 que convergem o sinal a p53/p21 (Shiloh, 2006; Lawless, 2010). A inibição da resposta da proteína mutada da ataxia telangiectasia (ATM – ataxia telangiectasia mutated) a danos ao DNA suprimiu a indução de senescência e levou ao aumento do tamanho e a invasibilidade de tumores em camundongos (Bartkova, 2006). A senescência pode ser então um mecanismo antitumoral alternativo de resistência a apoptose, de acordo com o perfil de expressão de proteínas apresentado nas células estudadas (Collado, 2007; Lleonart, 2009).

O padrão molecular e as causas que levam à senescência podem ser bastante similares aos de apoptose. O fator determinante do destino da célula é a magnitude do estresse sofrido, sendo que maiores danos normalmente levam a apoptose enquanto que danos menores levam à senescência (Ewald, 2010). O bloqueio de apoptose pode surgir pela inibição de caspases e o aumento da expressão de BCL2 observado em carcinomas humanos, sendo este um ponto de grande interesse para a compreensão e regulação das duas vias na terapia do câncer (Crescenzi, 2003).

A senescência celular é atrativa para as terapias de tumores porque tem importante efeito na contenção da proliferação (figura 13). Em tumores em que a apoptose está inacessível, a parada irreversível da estagnação do ciclo celular pode ser bastante desejável (Lleonart, 2009). O efeito de muitos quimioterápicos já em uso na terapia do câncer são indutores de senescência *in vitro*, como

Doxorrubicina, um indutor de dano ao DNA (Rebbaa, 2003; Eom, 2005). Por outro lado, deve-se considerar também que células em senescência seguem biologicamente ativas, secretando metabolitos similares a tumores malignos, podendo ser também pró-tumorigênico (Coppé, 2010).

Em gliomas a senescência pode ser induzida através do aumento de expressão de p16INK4a (Uhrbom, 1997), ou através de quimioterápicos como TMZ (Gunther, 2003) e Doxorrubicina (Rebbaa, 2003; Eom, 2005). Em outro trabalho também foi observado que o uso de polifenóis como resveratrol e a combinação resveratrol e quercetina foram capazes de induzir senescência em linhagem de GBMs de ratos, mostrando que a senescência pode ser uma via alternativa a apoptose em tumores resistentes como GBMs (Zamin, 2009).

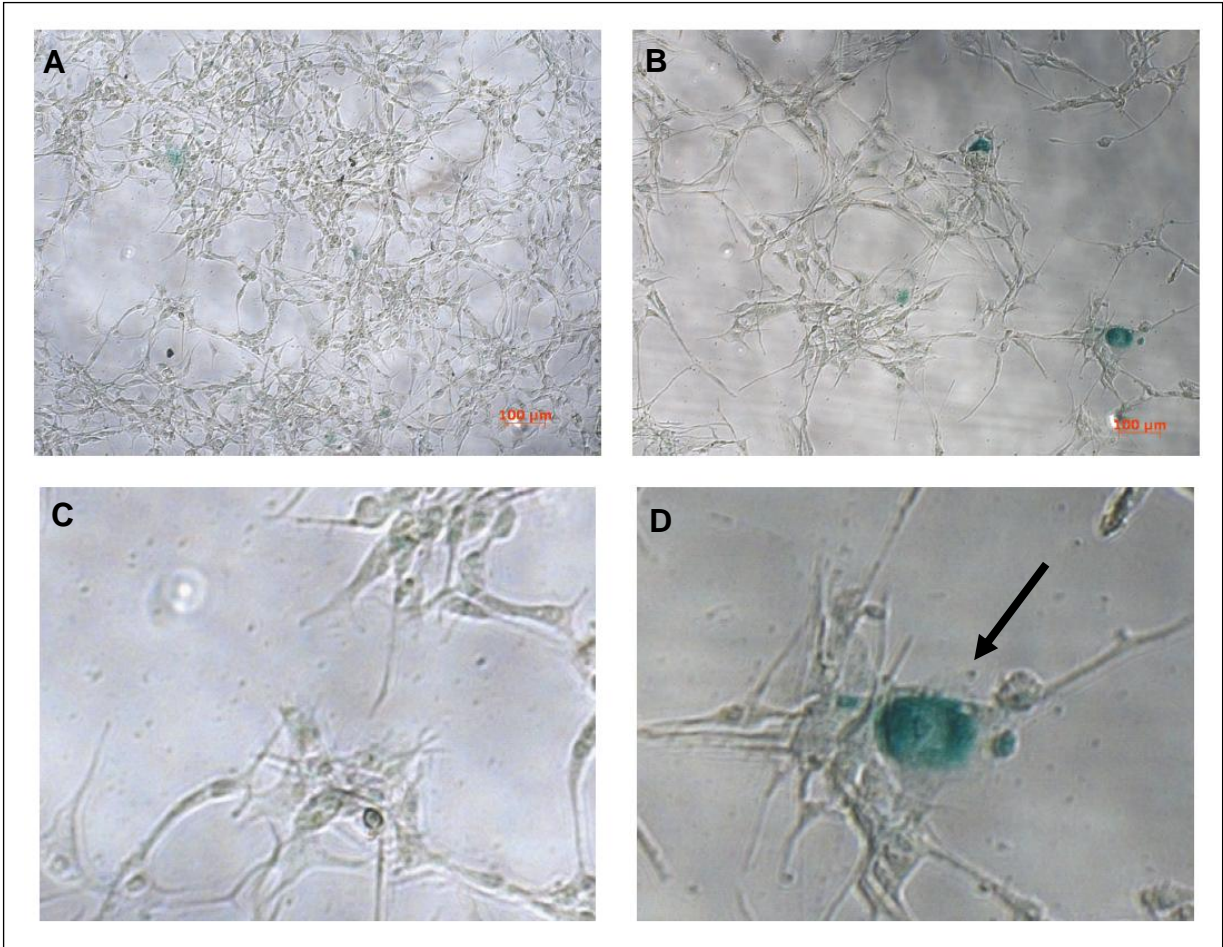


Figura 13. Senescência celular afeta a proliferação de gliomas. Células da linhagem de gliomas U87-MG mantida por cinco dias (A) e tratadas com Resveratrol 30 μ M (B). Em C e D as fotos foram igualmente ampliadas, onde se percebe além da coloração β -gal positiva, o aumento do tamanho da célula senescente (seta em D). (Dados não publicados)

4. Família das Proteínas Inibidoras de Apoptose

A pluricelularidade conquistada pelos organismos eucariontes exigiu o equilíbrio complexo de vias de regulação do desenvolvimento, diferenciação e morte celular. O controle do número de células presentes em um indivíduo é finamente regulado, e alterações em componentes reguladores estão associadas a muitas doenças em humanos (Salvesen, 2002). Assim, as IAPs, uma família bastante conservada de proteínas reguladoras do estímulo de morte celular, estão alteradas em doenças neurodegenerativas e em vários tipos de tumores (Hunter, 2007; LaCasse, 2008).

IAPs foram primeiramente observadas em células do inseto *Spodoptera frugiperda* (SF-21)(figura 14) infectada com baculovirais em 1993, num estudo de reguladores de viabilidade celular de células hospedeiras ao longo de uma infecção viral (Crook, 1993). A IAP viral foi capaz de inibir a apoptose das células SF-21 de forma similar ao já registrado com p35 em *Autographa californica*, outro inseto (figura 15). A IAP identificada possuía gene de 1,6 kb e codificava uma proteína de 31 kDa contendo motivos do tipo *zinc finger* (dedo de zinco)(Wei 2008). Posteriormente, vários ortólogos em diversas espécies foram identificados apresentando de uma a três motivos protéicos N-terminais BIR e um domínio RING na posição C-terminal em alguns membros da família (figura 16)(Salvesen, 2002; Riedl, 2004). O motivo BIR é composto por



Figura 14. *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartcho), organismos em que a família das proteínas Inibidoras de Apoptose foi primeiramente estudada.
Fonte:
<http://tinyurl.com/c4wt25m> (capturado em 31/03/2012)

aproximadamente 70 aminoácidos com características que suportam interações com outras proteínas. BIR1, BIR2 e BIR3 são assim denominados de acordo com a ordem evolutiva na filogenia. O domínio RING presente em algumas IAPs, contém um átomo de zinco quelado por três cisteínas e uma histidina e outro átomo de zinco ligado a quatro cisteínas. Estão presentes em algumas IAPs o domínio CARD (*caspase activations recruitment domain*), uma alça de fosfato e um domínio conjugador de ubiquitina (Wei, 2008). Na tabela 2 estão listados os membros da família IAP, as principais interações protéicas e participação na biologia dos tumores (Liston, 2003; Wei, 2008).



Figura 15. *Autographa californica*, organismo em que a inibição de apoptose por p35 foi observada.

Fonte:

<http://tinyurl.com/c8v9rul>
(capturado em 31/03/2012).

Fonte:

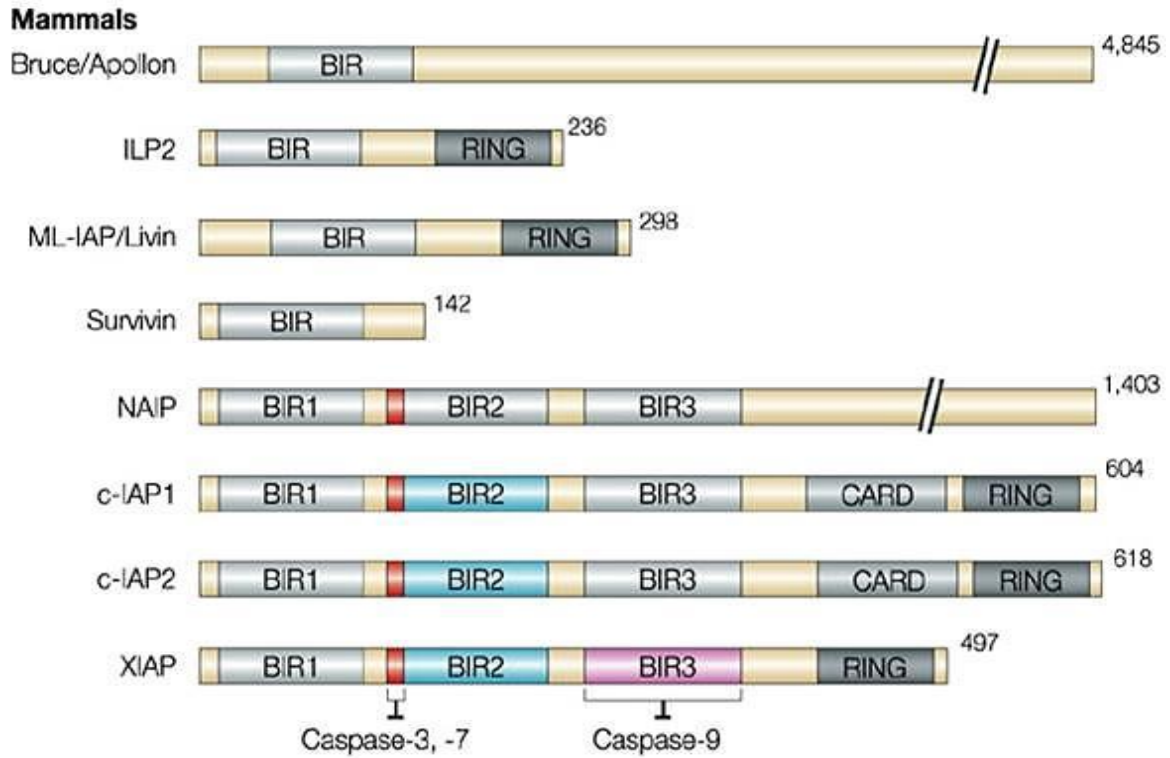


Figura 16. Família Inibidora de Apoptoses (IAP) de mamíferos. As proteínas inibidoras de apoptose representadas na figura, XIAP (*X-linked IAP*), c-IAP1, c-IAP2, ILP2 (*IAP-like protein-2*), ML-IAP (*melanoma IAP*)/Livin, NAIP (*neuronal apoptosis-inhibitory protein*) e survivina tem em comum a presença do domínio BIR 1. As regiões de interação com caspase 3 e 7 estão representadas em vermelho, e caspase 9 em rosa. Adaptado de Riedl (2004).

Tabela 2. Principais características das proteínas membro da família IAP.

IAP	Interações protéicas	características	Expressão	referência
BRUCE / APOLLO / BIRC 6 <i>BIR-repeat containing ubiquitinating conjugating enzymesystem</i>	Caspase 3 e 7 Interação com a via do receptor TNF	528 kDa Presente no complexo de golgi e algumas vesículas Anti-apoptótico	Amplamente expresso entre os tecidos.	(Hauser HS 1998; Bartke T and Jentsch 2004; Wei Y. 2008)
ILP2 / TS-IAP / BIRC 8 <i>IAP like protein 2</i>	Caspase 9	35 kDa superexpressão não inibe apoptose via receptores, mas sim por Bax, Apaf-1 e caspase 9.	Em testículos adultos.	(Richter B.W.M. 2001)
ML-IAP / LIVIN/ KIAP / BIRC 7 <i>Melanoma IAP</i>	Caspase-3, 7 e 9. Smac / DIABLO	~37 kDa Predominantemente no citoplasma. Inibidora de apoptose através da sinalização dos receptores de morte, e de caspase 3 e 9.	Rim e fígado fetal, testículos e timo adultos. Presente na maioria das linhagens de melanomas.	(Vucic D. 2000)
Survivina / TIAP / BIRC5	Caspase 3 e 7 β-tubulina Smac / DIABLO Fosforilada por Cdc2 e PKA Aurora B INCEMP Borealina/Darsa B XIAP	16,5 kDa participa da formação do cinetocore dos cromossomos para o fuso mitótico. Frac inibição de apoptose; inibição da atividade de caspases.	Fígado, rim, pulmão, trato gastrointestinal fetais. Altamente expresso em tumores. Presente na maioria das linhagens de melanomas.	(Ambrosini G. 1997; Du C. 2000; Dario C. Altieri 2001; Dohi, Xia et al. 2007; Dubrez-Daloz L. 2008; Darding M 2011)
NAIP / BIRC1 <i>Neuronal apoptosis Inhibitory protein</i>	Caspase 3 e 7 Hipocalcina	160 kDa Participa da proteção de células neuronais.	Fígado, placenta, sistema nervoso central adultos	(Roy N. 1995; Mercer E.A. 2000)
c-IAP1 / hIAP / MIHB / BIRC2 <i>Cellular IAP 1</i>	Caspase-3, 7 e 9. Smac / DIABLO Omi/ HtrA2 TRAF1 TRAF2	69 kDa Inibida em apoptose induzida por TRAIL em células hepáticas. Ubiquitinam e ativam RIP1.	Presente na maioria dos tecidos humanos e altamente expresso em timo, testículo e ovários adultos. Linhagens de carcinoma renal e hepático.	(Rothe M. 1995; Lu X 2005; Guicciardi M.E. 2011)
c-IAP2 / hIAP2 / MIHC / BIRC3 <i>Cellular IAP 2</i>	Caspase-3, 7 e 9. Smac / DIABLO Omi/ HtrA2 TRAF1 TRAF2 Bcl-10	72 kDa Ubiquitinam e ativam RIP1.	Maioria dos tecidos humanos. Altamente expresso no baço e no timo adulto. Linhagens de carcinoma renal e hepático.	(Rothe M. 1995; Lu X 2005; Guicciardi M.E. 2011)
XIAP / ILP-1 / MIHA / BIRC4 <i>X-linked Inhibitor of Apoptosis</i>	Caspase-3, 7 e 9. Omi/ HtrA2 XAF1 ARTS TAB1 NRAGE Akt Smac / DIABLO Transcrição dependente de NFκβ e JNK Survivina	53 kDa Principal inibidora de apoptose. Inibida em apoptose induzida por TRAIL em células hepáticas.	Maioria dos tecidos humanos. Altamente expresso em tumores.	(Liston P. 2001; Liston P. 2003; Bartke T and Jentsch 2004; Dohi, Xia et al. 2007; Hunter A.M. 2007; Gagnon V 2008; Rumble JM 2008; Garrison, Correa et al. 2011; Guicciardi M.E. 2011)

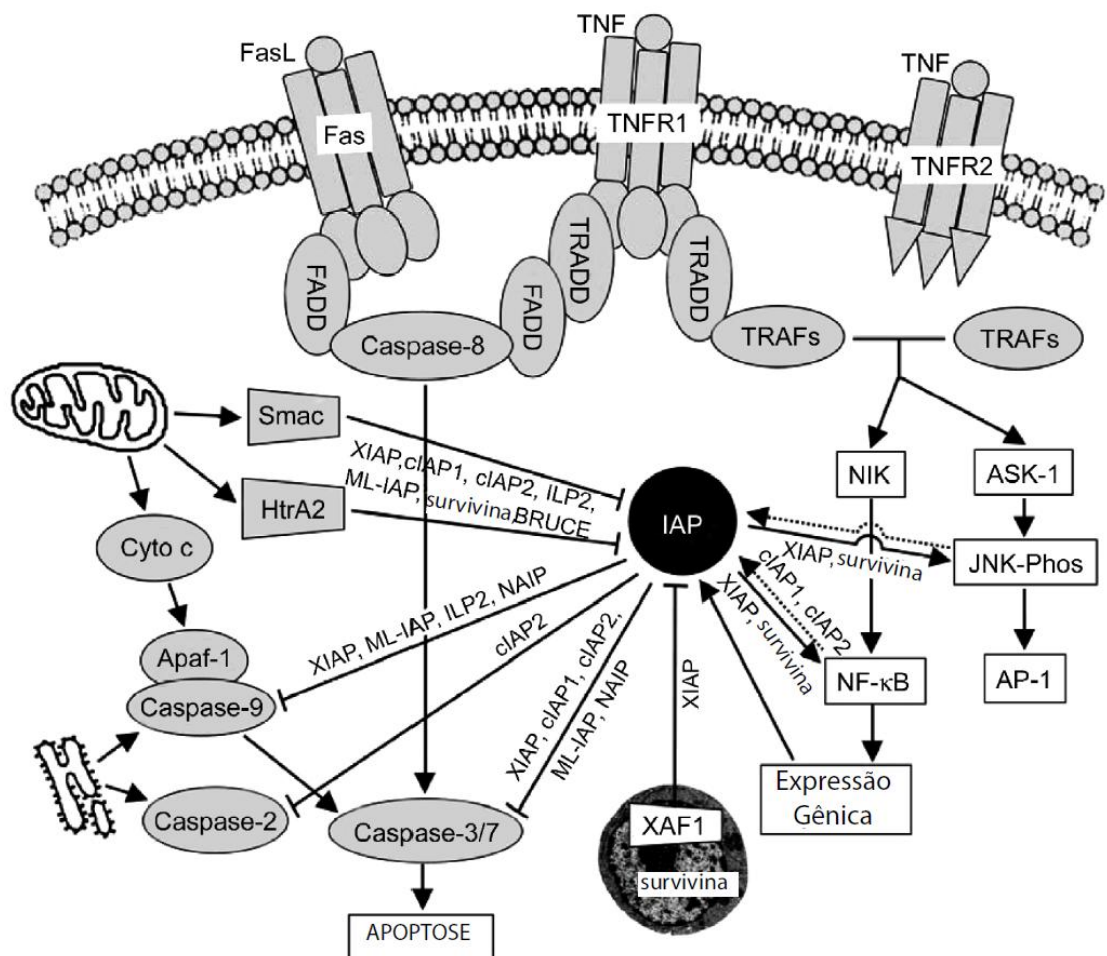


Figura 17. Mecanismos Regulatórios de IAPs em apoptose. A figura representa a complexidade da rede de sinalização que é regulada por diferentes membros das IAPs. IAPs são negativamente reguladas por antagonistas como SMAC, HtrA2 e XAF1, e executam mecanismos de retroalimentação positiva através das vias de NF- κ B e JNK. Adaptados de Wei (2008).

A família das IAPs é considerada um importante alvo para terapias de tumores como hepatocarcinomas (Augello, 2009), câncer de próstata (Gill, 2009), entre outros. Observando o padrão tumoral de IAPs, a alta expressão de survivina chama atenção por não ser encontrada em tecidos saudáveis e adultos, havendo

principal função na fase embrionária, assumindo um importante papel como marcador de malignidade tumoral (Ambrosini, 1997; Vucic, 2000; Hunter, 2007; Augello, 2009). A alta expressão de XIAP também aparece associada aos piores prognósticos de tumores como em leucemia mielóide aguda, mas ainda com expressão variada em diferentes tumores como carcinoma de pequenas células de pulmão, XIAP não teve a mesma correlação de malignidade (Ferreira, 2001; Carter, 2003; Schimmer, 2004).

O desenvolvimento de inibidores de IAPs através de inibição com de SMAC/DIABLO demonstraram boas perspectivas (Du, 2000) até a construção de diversos miméticos, antisensos, antagonistas, inibidores de ubiquitinação e repressores transcricionais (LaCasse, 2008; Darding, 2011) como ferramentas. Os antagonistas de IAPs se caracterizam pela presença de uma alanina na posição 1 que ancoram na superfície de domínios BIR, atingindo assim todos os membros da família IAP (Gyrd-Hansen, 2010). A indústria farmacêutica vem investindo em inibidores de IAPs, para linfomas principalmente, mas com a perspectiva de ampliar o uso para diversos tumores (Gyrd-Hansen, 2010).

4.a. XIAP

A proteína XIAP de mamíferos é a membro da família das IAPs mais estudada, especialmente pela mais alta capacidade de inibir caspases (Deveraux, 1997; Scott, 2005). Em realidade, para alguns autores, XIAP é a única IAP que comprovadamente tem interação física com caspases *in vivo*, enquanto para c-IAP1 e c-IAP2 apenas foi demonstrada interação *in vitro* (Eckelman, 2006; Altieri, 2010). XIAP tem 53 kDa e é formada por três domínios BIR e um domínio RING.

BIR é um domínio compacto composto por 70 resíduos do tipo dedos de zinco, com 3 fitas β e 4 α -hélices caracterizados por resíduos de histidina e cisteína que quelam o átomo zinco (Riedl, 2001). O domínio BIR2 possui sítios de interação com caspase 3 e 7, enquanto BIR3 permite interação com caspase 9 (Deveraux, 1999) (figura 18). Analisando a estrutura de XIAP, foi inicialmente proposto que a atividade de caspases não era inibida apenas devido a características do domínio BIR2, mas que havia também a participação da região N-terminal da proteína (Riedl, 2001). Mas induzindo mutações em sítios de BIR2 foi possível determinar a importância desse domínio na inibição de caspases executoras além da localização de dois sítios fundamentais para a intensidade da inibição (Scott, 2005). Já o domínio RING é um E3 ubiquitina ligase que aciona a degradação proteossomal de XIAP, caspase 3 e SMAC/DIABLO (Du, 2000).

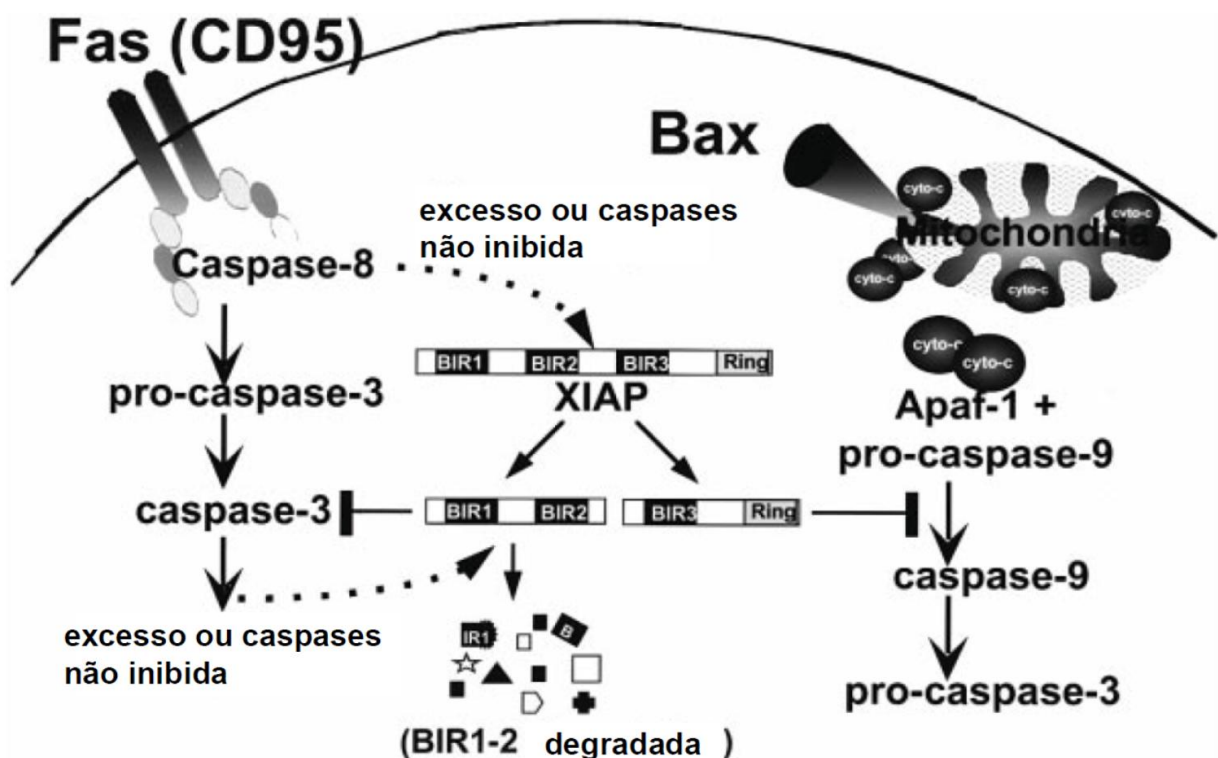


Figura 18. Modelo de inibição diferencial das vias apoptóticas de Fas e Bax pelos fragmentos de XIAP. XIAP pode ser clivada por caspase 8 a montante da via, gerando fragmentos que podem inibir caspases 3 e 9. A quantidade maior de caspases 3 pode levar a degradação dos fragmentos que contém os domínios BIR1 e BIR2. Adaptados de Deveraux (1999).

Em tecidos saudios adultos e fetais há expressão do mRNAs de XIAP, enquanto em várias linhagens de gliomas e em muitos outros tumores estes níveis estão bastante aumentados (Wagenknecht, 1999; Hunter, 2007). No entanto, existem exceções em que a expressão de XIAP não indica malignidade tumoral como já descrito aqui em carcinoma de pequenas células de pulmão (Ferreira, 2001). Apesar de XIAP ser a principal IAP com clara importância na via apoptótica, testes realizados em camundongo nocaute de XIAP surpreenderam

pela viabilidade e ausência de alterações na indução de apoptose (dependente ou independente de caspases). No entanto esses animais apresentaram como mecanismo compensatório uma maior expressão de c-IAP1 e c-IAP2 (Harlin, 2001).

A perda da integridade da membrana mitocondrial permite a liberação, além de citocromo c, das proteínas como SMAC/DIABLO, HTRA2/omi e ARTS (Garrison, 2011), entre outras, capazes de inibir a ação de XIAP ligando-se a mesma através de domínios IBM (*IAP binding motif*) (Galban, 2010). O principal antagonista SMAC/DIABLO, se liga no mesmo sítio de caspase 9 em XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e survivina; permitindo que as caspases executoras estejam livres para sinalizar a apoptose (Du, 2000). Esse antagonismo pode ser impedido pelo estímulo de morte por receptores Fas CD95 como visto num estudo em que a superexpressão de XIAP inibiu caspase 3 e reduziu o sinal de morte enviado pelas mitocôndrias. Isso mostra que a atuação anti-apoptótica de XIAP pode atingir a montante da ativação mitocondrial, inibindo caspases e a via apoptótica pela via intrínseca e extrínseca (Deveraux, 1997; Wilkinson, 2004) e que os níveis de expressão dessa proteína podem ser determinantes quanto ao destino da célula. Por ser um alvo promissor da terapia do câncer, a busca por antagonistas sintéticos (Schimmer, 2004; Orzaez, 2011), miméticos de SMAC/DIABLO (Probst, 2010) e alternativas de silenciamento da expressão de XIAP (McManus, 2004; LaCasse, 2006; Naumann, 2007; Carter 2011), vem fomentando muitos trabalhos que até o momento confirmam as expectativas de que a inibição de XIAP aumenta a sensibilidade das células a apoptose.

A inibição de XIAP pode ser feita também pela retirada de XIAP do citoplasma, impedindo a ligação com caspases e pela redução da expressão da mesma. XAF1 (XIAP associated factor 1), uma proteína capaz de antagonizar XIAP ao seqüestrá-la para o interior do núcleo, aparece com baixa expressão na maioria das linhagens de câncer (Liston 2001). Dessa forma, a relação XIAP/XAF1 pode ser mais informativa que somente a quantidade de XIAP ao analisar a malignidade de um tumor (Liston, 2001; Augello, 2009).

A constatação de que XIAP poderia participar da via de ubiquitina-proteassoma veio de um estudo realizado em timócitos, em que a indução de morte induzida por dexametasona pôde ser evitada com inibidores de proteassoma (Yang, 2000). Nesse trabalho foi visto que na ausência de RING, XIAP inibia ainda mais a apoptose. A ubiquitinação de proteínas envolve a atuação seqüencial da enzima ativadora de ubiquitina E1, da enzima conjugadora E2 e da enzima ubiquitina ligase E3. Esta última, responsável pela especificidade do processo, depende da interação com RING, mostrando que a presença desse domínio nas IAPs está relacionada à autorregulação dessas proteínas. É incerto ainda se a ubiquitinação de XIAP é causa ou consequência da morte celular (Galban, 2010).

XIAP regula através de sua atividade ubiquitina ligase E3 os níveis de COMMD1, uma proteína associada à forma canina de uma toxicose por cobre. Essa mesma proteína se encontra mutada em casos de toxicose humana, colocando XIAP na posição de um importante regulador da homeostase de cobre. Em pacientes com a doença de Wilson, que se caracteriza pelo acúmulo de cobre, os níveis e a conformação de XIAP se encontram alterados de forma a

acelerar a degradação da mesma. O cobre é capaz de se ligar a XIAP, reduzindo significativamente a habilidade de inibir caspase 3, tornando as células desses pacientes mais suscetíveis a apoptose (Mufti, 2006; Mufti, 2007).

Mutações em XIAP são relacionadas a uma doença genética rara. Entre as características genéticas da síndrome linfoproliferativa ligada ao X (XLP), ou síndrome de Duncan, estão mutações em XIAP que levam a alterações na expressão e função da proteína. Mutações em um único nucleotídeo do gene de XIAP foram encontradas em famílias portadoras dessa síndrome de imunodeficiência rara marcada por linfocitose, hipogamaglobulinemia e linfomas geralmente em resposta a infecção pelo vírus Epstein-Barr (Rigaud, 2006).

Contudo, XIAP possui um marcante papel na regulação da apoptose que mesmo não sendo completamente compreendido, vem se posicionando como um importante alvo terapêutico para tumores através de inibidores. A participação na via de regulação do cobre mostra ainda que essa proteína pode ainda ser relacionada a muitas outras vias de regulação da homeostase celular.

4.b. Survivina

Survivina é uma proteína não detectável em tecidos adultos diferenciados saudáveis, com exceção do timo. A expressão de survivina ocorre principalmente ao longo do desenvolvimento fetal e nos tecidos tumorais entre as fases G2/M do ciclo celular (Ambrosini, 1997; Altieri, 2001; Salz, 2005). É uma proteína membro da família das IAPs que apresenta 16,5 kDa, é composta por apenas um domínio BIR(BIR1) e uma região c-terminal α -hélice (Ambrosini, 1997). Diferente de outras

IAPs, survivina parece possuir atuação mais acentuada durante a mitose que na indução de apoptose.

Estudos mostram que survivina responde a estímulos apoptóticos, mas de forma menos atuante que outras IAPs e Bcl-2 (Tamm, 1998). Em melanócitos foi demonstrado *in vivo* que o aumento da expressão de survivina estava ligado à redução do volume do tumor e de apoptoses espontâneas (Grossman, 2001). Por outro lado, em queratinócitos expressão transgênica *in vivo* não alterou a diferenciação e proliferação (Grossman, 2001).

Diferente das outras IAPs, a associação com caspases e a inibição por SMAC/DIABLO não está clara, especialmente pela ausência de sítios de interação similares aos conhecidos para as outras IAPs (Huang, 2001; Srinivasula, 2008). Analisando a estrutura protéica foi observado que survivina é capaz de formar homodímeros e que a interação com caspases é pouco provável (Verdecia, Huang et al. 2000). No entanto, a inibição de survivina através do uso de antisenso e mutante dominante negativo, teve apoptose como resposta instantânea observada pelo aumento da atividade de caspase e taxa de proliferação reduzida (Chen, 2000).

O efeito de survivina na via apoptótica está vinculado a interações com outras proteínas da via como as próprias IAPs. Além do núcleo, a survivina pode se localizar ainda no citoplasma e no interior das mitocôndrias, cuja liberação é ativada com o estímulo apoptótico (Dohi, 2004). A survivina mitocondrial quando liberada previne a ativação de caspase 9 e, conseqüentemente, a formação do apoptossomo (Dohi, 2004). A interação com SMAC/DIABLO trouxe a possibilidade de survivina impedir a interação dessa proteína com XIAP, inibindo

apoptose (Song, 2003). No entanto, isso foi descartado no estudo de Dohi (2007). De outra forma, a survivina pode se ligar diretamente a XIAP, de acordo com o estudo que demonstrou que PKA fosforila survivina citosólica (e não mitocondrial) na posição Ser20, interrompendo a ligação com XIAP (Dohi, 2007). Dessa maneira, survivina promove estabilização da XIAP a ponto de inibir a interação com caspase-9, além de promover o estímulo do fator de transcrição NFκβ e aumento da expressão de IAPs (figura 19).

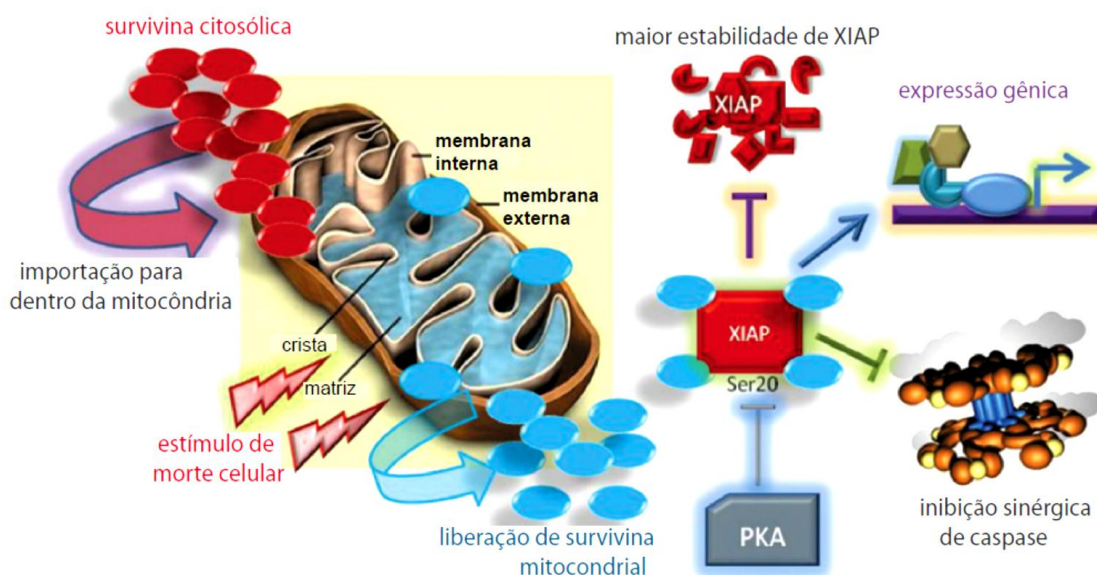


Figura 19. A citoproteção de survivina envolve a via citoplasmática-mitocondrial e cooperação com XIAP. Um conjunto de survivina é recrutado para dentro da mitocôndria, na maioria dos tumores, e liberados no citosol em resposta a estímulos de morte celular. Após a liberação de survivina mitocondrial, há formação de um complexo de survivina e XIAP que é negativamente regulado pela proteína PKA (proteína cinase A - proteína cinase A) que fosforila a survivina na posição de Ser20, resultando no aumento da estabilidade de XIAP contra a degradação proteossomal, aumento da expressão gênica por NF-κβ, e inibição sinérgica de caspases efetoras e iniciadoras. Adaptado de Altieri (2010).

O pico de expressão entre as fases G2/M do ciclo celular e a associação com fuso mitótico enfatizam a função de survivina na regulação de mitose (Li,

1998). Durante a divisão celular, a survivina faz parte do complexo cromossômico de passagem (CPC) formado por INCENP (*inner centromere protein*), e Aurora B e borealina (Jeyaprakash, Klein, 2007) cujas funções são desestabilizar o fuso de cromossomos impropriamente organizados, regulação dos níveis de BubR1; manter o checkpoint do fuso; promover a formação dos cromossomos ao fuso; promover a formação de microtúbulos associados a cromossomos; e controlar eventos tardios de citocinese (Lens, 2006; Ruchaud, 2007) (figura 20). Nesse cenário, survivina atua ainda na estabilização do fuso mitótico através da ligação aos microtúbulos na posição c-terminal α -hélice, reprimindo a dinâmica dos microtúbulos. A regulação fina da atuação da survivina na mitose pode ser dependente da ubiquitinação promovida por hFAM.

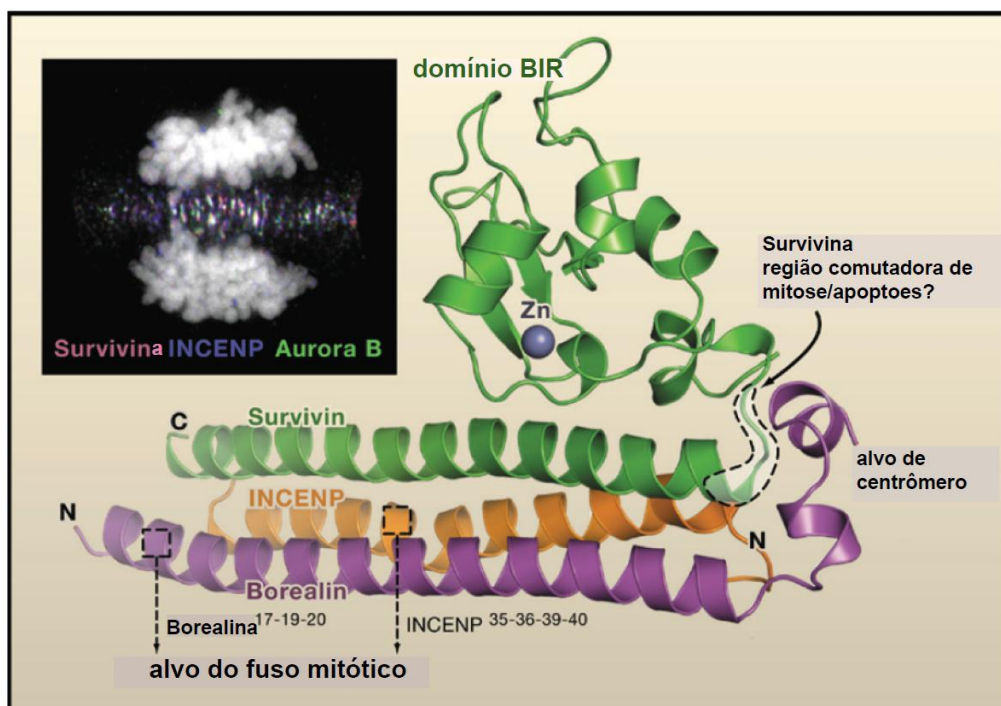


Figura 20. Estrutura em tripla-hélice do complexo de survivina inteiramente representada com fragmentos de INCENP e borealina. Survivina é um monômero nesse complexo devido à interface de dimerização (que pode ser crítica para as funções antiapoptóticas) está ocupada por borealina. Duas pequenas marcações em INCENP e borealina de aminoácidos alterados são

essenciais para a formação do complexo do fuso mitótico durante a anáfase. A micrografia de fluorescência indica a co-localização de survivina, INCENP e aurora B na zona central do fuso mitótico em anáfase de células humanas em cultura. Adaptado de Ruchaud (2007).

O envolvimento com chaperonas HSP90, HSP60 e AIP pontam ainda o envolvimento da survivina nas vias de estresse celular. Possivelmente essa interação seria uma forma de proteger a proteína da ação de proteassoma, ou ainda, auxiliar survivina na localização celular (Altieri, 2010). O complexo HSP90 e survivina leva a degradação proteassomal de survivina, além do efeito indutor de apoptose (via mitocondrial), falha na mitose e parada do ciclo celular (Fortugno, 2003).

Em pacientes com artrite reumatóide, os níveis de survivina puderam ser detectados na circulação e nos fluidos das articulações, indicando que survivina talvez possa ter alguma função no sistema imune (Bokarewa, 2007). No entanto, survivina é altamente relacionada a diversos tumores. Em GBMs a expressão de survivina é detectada em GBMs primários (Das, 2002; Jiao, 2004; Grunda, 2006) e secundários, mas o padrão se altera: survivina citoplasmática é mais presente entre GBMs primários que secundários (Xie, 2006).

A inibição da funcionalidade de survivina, estudada através de ferramentas como antisense e mutantes, apresentam alterações como a desregulação do centróssomo, fusos multipolares, poliploidia, culminando em catástrofe mitótica (Lens 2003; Okada, 2004; Altieri, 2006). Assim, survivina apresenta características de um bom marcador tumoral, assim como um bom alvo para terapia do câncer.

7. Hipótese

A hipótese deste trabalho é a de que o knockdown de XIAP ou survivina possa sensibilizar células de gliomas a quimioterápicos.

8. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do silenciamento de XIAP e survivina na resistência de células de gliomas a quimioterápicos.

a. Objetivos específicos

- Silenciar permanentemente linhagens de gliomas através de transdução de seqüências de RNAi contra as proteínas XIAP e survivina.
- Caracterizar as células silenciadas quanto ao crescimento, ciclo celular e a presença de senescência.
- Verificar a sensibilidade a apoptose de gliomas silenciados frente a fármacos.
- Verificar e caracterizar a participação de células-tronco tumorais no microambiente de gliomas silenciados com XIAP e survivina.

Capítulo II

**Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
(XIAP) knock down**

Patricia L. C. Lopez, Eduardo C. Fillipi Chiela, Andrew O. Silva, Elvira A. A.
Cordero, Daniel Garcia-Santos, Alessandra L. Pelegri, Gleice M. Reder,
Nicolle L. Barbieri, Guido Lenz.

Periódico: **Oncology**

Estado: **Publicado**

Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown

Patricia L.C. Lopez^a Eduardo C. Filippi-Chiela^a Andrew O. Silva^a
Elvira A.A. Cordero^a Daniel Garcia-Santos^b Alessandra L. Pelegrini^a
Gleice M. Reder^c Nicolle L. Barbieri^a Guido Lenz^a

^aBiophysics Department and Center of Biotechnology, and ^bDepartment of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, and ^cInstitute for Biomedical Research, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Key Words

Apoptosis · Doxorubicin · Gliomas · Senescence · shRNA · Vincristine · XIAP

Abstract

Objective: Glioblastomas are a kind of cancer with high resistance to treatments, requiring more efficient alternatives of treatment. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is highly expressed in gliomas and, due to its inhibition of caspases, can participate in resistance to therapy. Here we test the sensitization of glioma cells with XIAP gene knockdown (KD) to drugs used in chemotherapy. **Methods:** We silenced XIAP expression in U87MG glioblastoma using stable shRNA, and cells were treated with taxol, BCNU, temozolomide, cisplatin, etoposide, resveratrol (Rsv), vincristine and doxorubicin. We analyzed cell viability, cell cycle, apoptosis and senescence. **Results:** XIAP KD cells were more sensitive to etoposide, Rsv, vincristine and doxorubicin compared to wild-type (WT) cells. Doxorubicin 1 μM and vincristine 100 nM induced higher activation of caspases after 24 h and doxorubicin induced a higher degree of senescence induction in XIAP KD cells in relation to WT cells. Phospho-p53 and phospho-H2Ax Western blot indicate subsequent DNA damage

as an important effector of doxorubicin-induced death. **Conclusions:** This study suggests that XIAP inhibitors may sensitize gliomas to certain drugs and induce death and that the mechanisms of sensitization involve apoptosis, senescence and p53 signaling.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM), the most common primary tumor of the central nervous system, classified as grade IV by the WHO, is a very aggressive type of cancer with high resistance to conventional therapies such as surgery, and radio- and chemotherapy [1]. Life expectancy of patients with GBM in current treatment regimens is around 14 months. Beside the clinicopathological diagnosis used to distinguish among GBM grades, a molecular approach can improve the knowledge and predict drug response. In this sense, knowing the resistance mechanisms present in these cells, and mainly overcoming this resistance, is a fundamental part of conquering resistance.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
0030-2414/12/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ocl

Guido Lenz
Departamento de Biofísica, IB, UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431, Sala 107
Campus do Vale, Porto Alegre, RS 91501-970 (Brazil)
Tel. +55 51 3308 7620, E-Mail lenz@ufrgs.br

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Surgery followed by temozolomide (TMZ) and carmustine (bis-chloroethylnitrosourea, BCNU) wafer together with radiotherapy are the classical therapeutic options for GBM [1, 2]. These treatments induce DNA damage, leading to several cellular processes such as apoptosis [3], autophagy [4] and senescence [3]. Several other drugs are being tested, but restriction of neurotoxicity, biodistribution and, mainly, efficacy due to intrinsic resistance have hampered the development of new therapeutic alternatives for GBM [5–7]. Pharmacological or genetic inhibition of resistance has increased the efficacy of some drugs [8] and is an important tool for the improvement of current therapies.

Genetic alterations in GBMs are concentrated in three main signaling pathways: the Rb (retinoblastoma) pathway; the RTK (receptor tyrosine kinase), Ras and PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) pathway, and the p53 pathway. Among these, Rb affects mostly the cell cycle, while RTK/Ras/PI3K pathways are very pleiotropic, which includes a strong anti-apoptotic signal [9]. Defects in p53 are an important way of reducing apoptosis activation, and these defects are observed in 87% of GBM [1]. p53 signaling also has several targets which include cell cycle block [10], reprogramming [11] and apoptosis [12]. This is mediated by increased transcription of the proapoptotic proteins PUMA, Noxa and BAX, which leads to the opening of mitochondrial pores and release of cytochrome c and SMAC/DIABLO, an XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) inhibitor [13].

XIAP is a member of the inhibitor of apoptosis family of proteins (IAP) with 3 different BIR (baculovirus IAP repeat) domains, which directly interact with caspase 3, 7 and 9. In humans, XIAP is expressed during development and overexpressed in many tumors, including gliomas [14, 15]. Since XIAP blocks apoptosis in its final steps in a dominant way, its overexpression generally abolishes apoptosis [16]. Deletion of XIAP generates normal mice but with higher expression of other IAPs, suggesting that these members of the IAP family may compensate XIAP during development [17].

Resistance to apoptosis is an important hallmark of cancer cells. Genetic alterations impair normal apoptosis induction at several points of the apoptosis signaling cascade, including receptors, control of mitochondrial pore opening and caspase activation [18]. Among these, overexpression of caspase inhibitors, such as XIAP [19] and survivin [20], are the most dominant inhibitors of apoptosis, since these proteins dominantly block all other forms of apoptosis induction, as they block the final steps of apoptosis, i.e. caspase 3 activation [18].

In this study, we show that stable knockdown (KD) of XIAP in GBM cells sensitizes cells to drugs used in chemotherapy, such as vincristine and doxorubicin, and the mechanism of this sensitization is explored by analysis of apoptosis, cell cycle and senescence.

Methods

Cell Culture and Treatment

The human cell lines U87MG and Hek 293t were obtained from ATCC (Rockville, Md., USA), grown in a humidified incubator at 5% CO₂ and 37°C, and maintained in DMEM-low glucose medium (high glucose for Hek 293t) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. All culture reagents are from Gibco Laboratories (Grand Island, N.Y., USA). All drugs were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA). The doses tested for doxorubicin and etoposide were 0.1–10 μM; resveratrol (Rsv) and BCNU, 10–100 μM; quercetin, 0.1–1 μM; taxol, 10–20 nM; TMZ, 100–300 μM; cisplatin, 0.16–16 μM, and vincristine, 10.8–1,080 nM. U87MG cells were plated at a density of 2×10^3 cells/well in 96-well plates 24 h before treatment. Cells were cultured for 48 h at different concentrations of each drug, in a total volume of 100 μl per well.

shRNAi Transduction

shRNAi sequences were obtained from a Mission RNAi library in a PLKO plasmid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA); the sequences used to silence human XIAP (baculoviral IAP repeat-containing 4 -NM001167) were GCACTCCAACCTTCTAATCAAA and CAGAATGGTCAGTACAAAGTT. Lentivirus production was performed by co-transfecting Hek 293t cells with SuperFect transfection reagent (Qiagen) complexed with three virus packaging plasmids: (1) RRE; (2) Rev, and (3) VSVG, and the shRNAi expression plasmid containing a puromycin resistance gene [21]. As a control of transduction, we used pLL3.7 Lentilox with GFP sequence or a PLKO plasmid with a sequence targeting GFP (shGFP). shGFP-transduced and wild-type (WT) cells were similar in a clonogenic assay of untreated and TMZ-treated cells. The supernatants were first collected after 48 h and added to glioma U87MG culture plus Polybrene 8 μg/ml. Puromycin selection was performed for 10 days after 72 h of transduction.

Nuclear Morphometric Analysis

Briefly, cells were plated at 2×10^3 cells/well in a 96-well plate, followed by treatments as indicated. After treatments, cells were fixed with 4% formaldehyde (v/v in PBS) for at least 1 h at room temperature and subsequently maintained in PBS. Next, fixed cells were marked with a solution containing 300 nM DAPI and 0.1% Triton X-100 (v/v in PBS) for 1 h at room temperature, followed by quantification of the images obtained with DAPI staining using the Software Image Pro Plus 6.0 (IPP6; Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA). The parameters, roundness, aspect, radius ratio and area box were quantified and grouped in an index, named nuclear irregularity index (NII), which is composed of the sum of aspect, radius ratio and roundness, subtracted by the value of area box. Data are presented as a plot of the area versus NII, in which normal nuclei were considered the nuclei within 2 SD of the mean of a population of nuclei obtained from un-

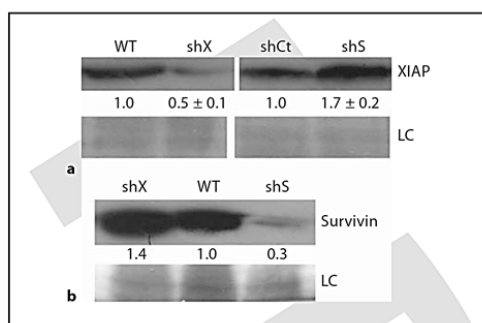


Fig. 1. U87MG XIAP KD cells present higher expression of survivin. Western blots of XIAP (**a**) and survivin (**b**) of U87 XIAP KD cells (shX), WT, control shRNA (shCt) and survivin KD (shS). Loading control (LC) represents PVDF membranes stained with Coomassie blue. Means \pm SEM of band intensity divided by the intensity of LC in relation to WT.

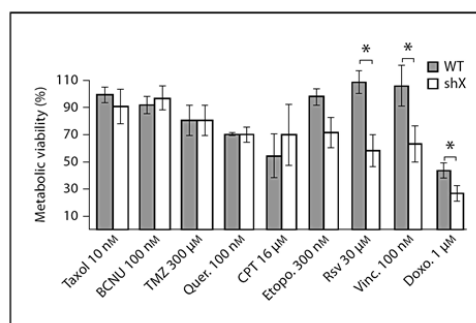


Fig. 2. XIAP KD sensitizes U87 GBM cells to vincristine and doxorubicin. Cell viability was measured after 48-hour treatments with taxol 10 nM; BCNU 100 nM; TMZ 300 μ M; quercetin (Quer.) 100 nM; cisplatin (CPT) 16 μ M; etoposide (Etopo.) 300 nM; Rsv 30 μ M; vincristine (Vinc.) 100 nM, and doxorubicin (Doxo.) 1 μ M. Means \pm SEM of 3 independent experiments; * $p < 0.05$ (paired t test).

treated cells. Nuclei were considered large and regular if >2 SD in size and <3 SD of NII, and irregular when >3 SD of the large population or >5 SD of the normal-sized population.

Statistical Analysis

All data were expressed as means \pm SEM and analyzed using ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test for multiple comparisons or paired t test. Data analysis was performed using the software GraphPad INSTAT (GraphPad Software, San Diego, Calif., USA).

The remaining methods used in the article can be found in the online supplementary Material and Methods (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/1.1159/000337978).

Results

XIAP KD Sensitizes GBM Cells to Chemotherapeutic Drugs

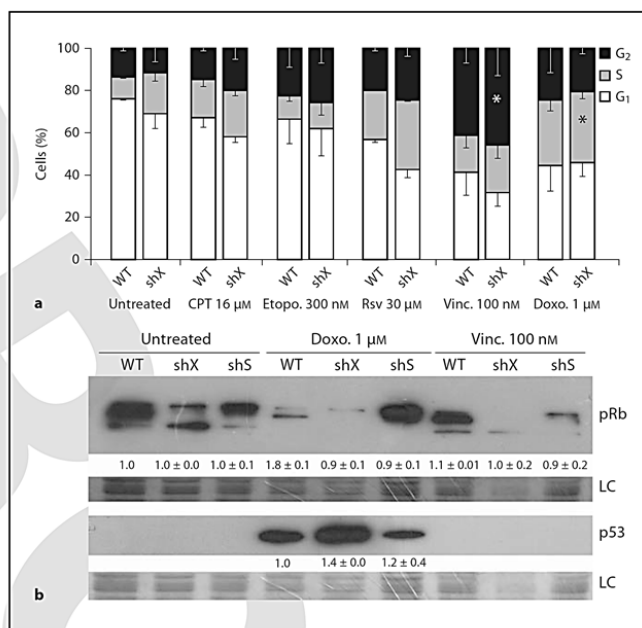
Stable KD of XIAP (shX) using lentivirus-delivered shRNAs produced a cell line with few morphological differences compared to the WT cells (online suppl. fig. S1A) and a virtually unaffected proliferation capacity (online suppl. fig. S1B). XIAP protein levels were reduced to 0.5 ± 0.1 of the levels of XIAP from WT cells or cells transduced with control shRNA (shCt; fig. 1a). Interestingly, survivin, another IAP member that inhibits caspases 3 and 7, was slightly increased in shX KD cells, while XIAP was increased in survivin shRNA (shS) KD cells (fig. 1b), suggesting a compensation among IAPs in this cancer cell

line. Two other shRNA sequences targeting XIAP were tested, but cells transduced with these sequences died during or shortly after the end of the selection process.

Next we tested the sensitivity of XIAP KD cells to several common drugs used in chemotherapy and also to molecules with anticancer potential, such as Rsv and quercetin [22]. Despite not being able to cross the blood-brain barrier, doxorubicin was studied because local delivery of this drug with biodegradable polymers or drug-eluting beads has improved the survival of rats with gliomas [23, 24]. Additionally, rats harboring an intracranial implant of U251 or U87MG cells presented increased survival when treated with polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin [25]. Interestingly, lipid-based nanoparticle formulations of doxorubicin reduced tumor size, and this effect is ascribed to normalization of the tumor vasculature [26]. We also tested classical DNA damage-inducing drugs (cisplatin, BCNU and etoposide) and microtubule-interacting drugs (taxol and vincristine) in order to search for potential mechanisms of synergy between genetic alterations and drugs used in the clinic.

These drugs were tested at sublethal doses, which were established in a dose-response analysis (online suppl. fig. S2) to uncover putative sensitization. Cell viability after 48 h of treatment was not different between XIAP KD and WT cells for taxol, BCNU, TMZ, quercetin, cisplatin or etoposide at the indicated concentrations (fig. 2; online suppl. fig. S2). On the other hand, Rsv, vincristine and

Fig. 3. a Cell cycle distribution after 24 h of treatment with cisplatin (CPT) 16 μM ; etoposide (Etopo.) 300 nM; Rsv 30 μM ; vincristine (Vinc.) 100 nM, and doxorubicin (Doxo.) 1 μM assessed by PI staining and flow cytometry; * $p < 0.05$ vs. untreated (paired t test). **b** Western blot of cell cycle proteins pRb and p53 in cells treated with doxorubicin (Doxo.) 1 μM and vincristine (Vinc.) 100 nM for 48 h. Means \pm SEM of 3 independent experiments of band intensity in relation to loading control (LC).



doxorubicin treatment produced a higher reduction in cell viability in XIAP KD cells than in WT cells (fig. 2). XIAP KD cells treated with doxorubicin and vincristine presented marked alterations in cell morphology, supporting the reduction in metabolic viability (online suppl. fig. S1C). Interestingly, silencing of XIAP did not sensitize another glioma cell line, U251, to doxorubicin at concentration ranges were U87MG, a p53 proficient cell line, was sensitized (online suppl. fig. S3).

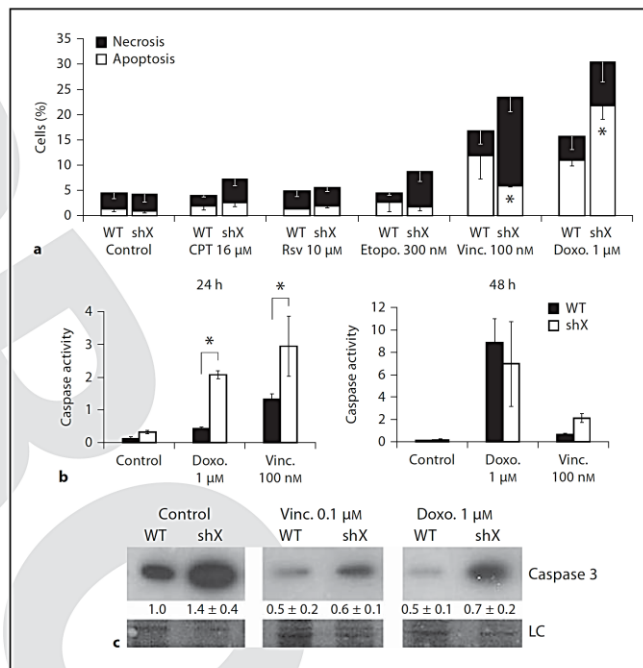
KD of XIAP Sensitizes GBM Cells to Vincristine- and Doxorubicin-Induced Apoptosis

Among the different drugs tested, only doxorubicin induced an increase in the population of cells in the S-phase or/and vincristine in the G₂ phase of the cell cycle. However, no significant differences were observed between WT and XIAP KD cells when treated with the indicated drugs (fig. 3a). Western blot of proteins involved in cell cycle regulation demonstrated some important differences between XIAP KD and WT cells. Phosphorylated Rb protein is reduced after doxorubicin treatment,

especially in XIAP KD cells. Interestingly, doxorubicin enhanced p53 protein levels, which was further increased in XIAP KD cells (fig. 3b).

XIAP KD led to a subtle increase in apoptosis after treatment with doxorubicin compared to WT, and a small increase in necrosis in vincristine-treated cells analyzed using annexin/propidium iodide (PI) staining and flow-cytometric analysis (fig. 4a; online suppl. fig. S4A). Rsv, etoposide or cisplatin did not induce an increase in apoptosis or necrosis at the concentrations tested (fig. 4a; online suppl. fig. S4A). Both doxorubicin and vincristine induced higher caspase 3/7 activity after 24 h of treatment in XIAP KD cells compared to WT cells. After 48 h, caspase activity was significantly higher than after 24 h of treatment (fig. 4b). After 48 h of treatment, when only 30% of cells remained viable (fig. 2), the activity of caspases was similar between XIAP KD and WT, suggesting that the cells with higher caspases activity were probably eliminated. Surprisingly, caspase levels were higher in XIAP KD cells than WT cells (fig. 4c), suggesting that compensatory mechanisms, such as the increase

Fig. 4. a Doxorubicin (Doxo) and vincristine (Vinc.) induce apoptosis and necrosis in XIAP KD cells. Annexin-FITC/PI analysis of U87 WT and shX cells treated for 48 h with cisplatin (CPT); etoposide (Etopo.); Rsv; vincristine (Vinc.), and doxorubicin (Doxo.) and quantification apoptosis (annexin positive and PI negative) and necrosis (annexin negative and PI positive). **b** Caspase 3/7 activity after 24 and 48 h of treatment with doxorubicin (Doxo.) 1 μM and vincristine (Vinc.) 100 nM measured with the degradation of a fluorogenic substrate is given as the inclination of the accumulation of the product generated. Means \pm SEM of 3 independent experiments; ANOVA was followed by SNK post hoc test; * $p < 0.05$. **c** Uncleaved caspase 3 Western blot of cells treated with vincristine (Vinc.) 100 nM or doxorubicin (Doxo.) 1 μM after 48 h. Means \pm SEM of 3 independent experiments of band intensity in relation to loading control (LC).



in survivin (fig. 1a), could have been selected to suppress caspase activity, despite higher levels of the caspase protein.

Induction of Senescence by Doxorubicin Is Increased by XIAP KD

Doxorubicin acts as topoisomerase II inhibitor and therefore leads to DNA damage, mainly in the form of double-strand breaks. Biological outcome depends on the cell and concentration of doxorubicin, normally including cell cycle arrest, apoptosis and senescence. Interestingly, inhibition of caspase switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence in neuroblastoma cells [27]. Cells treated for 48 h with 1 μM doxorubicin or 100 nM vincristine presented an increase in histone H2Ax phosphorylation (online suppl. fig. S4B) but no clear increase in DNA damage measured by comet assay, indicating some DNA damage caused by these drugs but still much less compared to methylmethane sulfonate at 400 μM (online

suppl. fig. S4C). Nuclear alterations occur in apoptosis (i.e. nuclear shrinkage followed by nuclear fragmentation), mitotic catastrophe (i.e. nuclear irregularities) and senescence (i.e. nuclear enlargement in a regular shape). The nuclear morphometric analysis of DAPI-stained nuclei revealed no increase in irregular nuclei, but an increase in cells with large and regular nuclei in cells treated for 48 h with doxorubicin and vincristine, suggesting senescence induction (fig. 5; online suppl. fig. S5A). Thus, the increased cell senescence in doxorubicin-treated cells suggested by nuclear analysis was confirmed with SA- β -galactosidase activity (online suppl. fig. S5B). KD of XIAP further increased the proportion of cells with large nuclei following doxorubicin treatment in comparison to WT cells (fig. 5). Concentrations of 1 μM , and 100 and 10 nM totally impeded the growth of colonies in a clonogenic assay, while 1 nM did not differentially affect the number of clones of XIAP KD and WT or shGFP cells (data not shown).

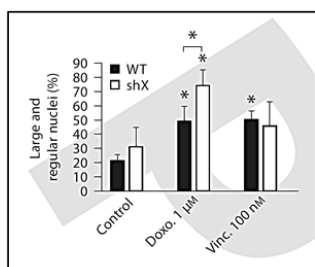


Fig. 5. Doxorubicin and vincristine affect nuclear morphology. Morphometric nuclear analysis of U87MG cells after 48 h of treatment with doxorubicin (Doxo.) 1 μ M and vincristine (Vinc.) 100 nM. The area (in pixels) and NII of each nucleus were measured from DAPI images. Quantification of large and regular nuclei as an indication of senescence induction. Means \pm SEM of 3 independent experiments; ANOVA was followed by SNK post hoc test; * $p < 0.05$ (see online suppl. fig. 5SA for more details).

Discussion

The use of lentiviral-delivered shRNAs to study gene silencing has the advantage of producing a stably silenced cell line, thus being able to better mimic genetic alterations that occur in cancer or even a chronic therapeutic interference of cancer therapeutics compared to the transient siRNAs [28]. Additionally, there are encouraging reports of direct injection of the virus into glioma tumors in a rat model [29] and considerable progress has been made in increasing selectivity [30], which is more difficult to attain with siRNAs.

When we silenced XIAP in the U87MG cell line, probably, there was a selection of tolerable level of XIAP reduction to maintain cell viability, since other shRNA sequences tested did not produce viable cell lines. Interesting to notice that the level of XIAP reduction we observed in the silenced cell line was around 50%, which induced an increase in other IAPs, such as survivin, which may be part of the mechanism of adaptation of these cancer cells. This is supported by the activation of apoptosis and XIAP reduction in acute myeloid leukemia cells in which XIAP was silenced by anti-sense [31] and in human breast cancer cells in which XIAP was silenced by siRNA [6]. Since our selection process takes at least 1 week, the cells more sensitive to XIAP reduction may have been eliminated, and the data presented here are an analysis of the cells that resisted to this reduction in XIAP.

Interestingly, reduction in XIAP levels induced a complex sensitization to different cancer drugs. While XIAP KD sensitized cells to etoposide, Resv, vincristine and doxorubicin, it did not sensitize cells to drugs like taxol, BCNU, TMZ and cisplatin. It is interesting to note that drugs acting on the same targets, such as taxol and vincristine, which act on microtubules, presented different abilities to kill XIAP KD gliomas. Others have observed a small sensitization of XIAP siRNA to etoposide and doxorubicin [6] or TRAIL and doxorubicin [32]. Interestingly, in melanoma cell lines, XIAP KD sensitized cells to TRAIL and taxol, but not to carboplatin and doxorubicin [33], suggesting a wide range of effects depending on the studied cell line. KD of XIAP did not sensitize U87MG or U251 glioma cells to up to 1 μ M of the radiomimetic drug bleomycin (data not shown). However, XIAP inhibitors sensitized glioma cells to high levels of ionizing radiation [34], suggesting that the levels of the death-inducing strategy may be important to uncover the sensitization.

Several compounds were shown to reduce the level of XIAP in glioma cells, such as kaempferol [35] ciglitazone [36], roscovitine [37] and sodium butyrate [38]. In the cases of roscovitine and sodium butyrate, forced expression of XIAP largely blocked the toxic effect of TRAIL, showing the importance of XIAP in the sensitivity of gliomas to death-inducing treatments. Therefore, XIAP-reducing pharmacological agents combined with the drugs that were potentiated by XIAP KD may act synergistically.

Doxorubicin induced a strong increase in p53, which was larger in XIAP KD cells than in WT cells or cells silenced for survivin, and this increase in p53 may be part of the mechanism of sensitization observed for doxorubicin in XIAP KD cells. This is supported by the observation that gastric cancer cells were only sensitized to cisplatin and mitomycin C with XIAP KD in p53 proficient cells [39]. The combination of enhanced p53 with reduced XIAP may be especially harmful for cancer cells, as also confirmed by other studies [40–42]. U87MG is a PTEN-negative cell line and PTEN is deleted in the majority of gliomas [9]. PTEN loss leads to high Akt activity, which can phosphorylate and stabilize XIAP [43]. Silencing of XIAP sensitized an ovarian epithelial cancer cell line to cisplatin only in cells overexpressing Akt, suggesting that this could be a mechanism that selectively sensitizes PTEN null cells to chemotherapeutic drugs.

Cell senescence is at least one of the effects of doxorubicin when cells do not enter apoptosis. Doses $< 1 \mu$ M for 48 h may induce cell senescence, while in cells treated with doses $> 10 \mu$ M, necrosis and apoptosis seem to be the main outcome [27]. This is supported by the observation

that concentrations as low as 10 nM of doxorubicin completely abolished clonogenic growth (data not shown). The fact that doxorubicin induced senescence as well as apoptosis and that these two effects were increased by XIAP KD in our study shows the potential of this combination for therapeutic purposes.

The main mechanism of action of vincristine is to block cell cycle progression via inhibition of microtubule assembly, which may or may not be followed by apoptosis depending on the cell type and concomitant treatment [44]. Vincristine did not induce an increase in p53 levels, and this treatment increased necrosis rather than apoptosis or senescence in XIAP KD cells when compared to WT cells, suggesting that the mechanisms of sensitization to vincristine or doxorubicin induced by XIAP KD differ.

Different patterns of sensitivity to a broad range of anticancer drugs were observed in XIAP KD cells, with topoisomerase inhibitors and inhibitors of microtubule

assembly presenting the best effects. Results for doxorubicin and vincristine deserve more attention as alternative treatment in combination with agents that inhibit XIAP. Our results show that long-term therapy with inhibitors of XIAP in gliomas with functional p53 may sensitize tumor cells to death induced by regular chemotherapeutic drugs.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Fabiana Horn and Dr. Artur B. Chies, who allowed us to use the equipment of their laboratories, and Tatiana P. Gonzalez for critical reading and suggestions on the paper.

Financial support was obtained from Pronex-Fapergs/CNPq (10/0044-3) and CNPq (473190/2004-4 and 420036/2005-9). P.L.C.L. and A.L.P. are recipients of CAPES fellowships, and E.C.F.-C., A.O.S., N.L.B., E.A.A.C. and G.L. are recipients of CNPq fellowships.

References

- 1 Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ: Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60:166–193.
- 2 Cohen MH, Johnson JR, Pazdur R: Food and Drug Administration drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2005;11:6767–6771.
- 3 Gunther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H, Terzis AJ: Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br J Cancer* 2003;88:463–469.
- 4 Natsumeda M, Aoki H, Miyahara H, Yajima N, Uzuka T, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Fujii Y: Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology* 2011;31:486–493.
- 5 Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E: Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008;13:259–271.
- 6 Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH: Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11:309–316.
- 7 Ma JJ, Chen BL, Xin XY: XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146:222–226.
- 8 Pavet V, Portal MM, Moulin JC, Herbrecht R, Gronemeyer H: Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene* 2010;30:1–20.
- 9 Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061–1068.
- 10 Vousden KH, Prives C: Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009;137:413–431.
- 11 Molchadsky A, Rivlin N, Brosh R, Rotter V, Sarig R: p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis* 2010;31:1501–1508.
- 12 Cotter TG: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009;9:501–507.
- 13 Nakamura H, Kumei Y, Morita S, Shimokawa H, Ohya K, Shinomiya K: Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti-apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector-averaged gravity condition. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:143–147.
- 14 Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG: The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007;12:1543–1568.
- 15 Wagenknecht B, Glaser T, Naumann U, Kugler S, Isenmann S, Bahr M, Korneluk R, Liston P, Weller M: Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell Death Differ* 1999;6:370–376.
- 16 Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300–304.
- 17 Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB: Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2001;21:3604–3608.
- 18 Fulda S: Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 2009;124:511–515.
- 19 Holcik M, Korneluk RG: XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:550–556.
- 20 Altieri DC: Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31–52.
- 21 Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72:8463–8471.
- 22 Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G: Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci* 2009;100:1655–1662.
- 23 Baltes S, Freund I, Lewis AL, Nolte I, Brinker T: Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: a pilot study in a rat model. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1393–1402.
- 24 Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H: Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res* 2005;25:3825–3831.

- 25 Kikuchi T, Saito R, Sugiyama S, Yamashita Y, Kumabe T, Krauze M, Bankiewicz K, Tomiyama T: Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. *J Neurosurg* 2008;109:867-873.
- 26 Verreault M, Strutt D, Masin D, Anantha M, Yung A, Kozlowski P, Waterhouse D, Bally MB, Yapp DT: Vascular normalization in orthotopic glioblastoma following intravenous treatment with lipid-based nanoparticulate formulations of irinotecan (Irinophor[®]), doxorubicin (Caelyx[®]) or vincristine. *BMC Cancer* 2011;11:124.
- 27 Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL: Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 2003;22:2805-2811.
- 28 Lenz G: The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1749-1757.
- 29 Huszthy PC, Giroglou T, Tsinkalovsky O, Euskirchen P, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, von Laer D, Miletic H: Remission of invasive, cancer stem-like glioblastoma xenografts using lentiviral vector-mediated suicide gene therapy. *PLoS One* 2009;4:e6314.
- 30 Miletic H, Fischer YH, Neumann H, Hans V, Stenzel W, Giroglou T, Hermann M, Deckert M, Von Laer D: Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther* 2004;15:1091-1100.
- 31 Carter BZ, Milella M, Tsao T, McQueen T, Schober WD, Hu W, Dean NM, Steelman L, McCubrey JA, Andreeff M: Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:2081-2089.
- 32 Spee B, Jonkers MD, Arends B, Rutteman GR, Rothuizen J, Penning LC: Specific down-regulation of XIAP with RNA interference enhances the sensitivity of canine tumor cell-lines to TRAIL and doxorubicin. *Mol Cancer* 2006;5:34.
- 33 McManus DC, Lefebvre CA, Cheriton-Horvat G, St-Jean M, Kandimalla ER, Agrawal S, Morris SJ, Durkin JP, Lacasse EC: Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene* 2004;23:8105-8117.
- 34 Vellanki SH, Grabrucker A, Liebau S, Proeper C, Eramo A, Braun V, Boeckers T, Debatin KM, Fulda S: Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia* 2009;11:743-752.
- 35 Jeong JC, Kim MS, Kim TH, Kim YK: Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res* 2009;34:991-1001.
- 36 Kang DW, Choi CH, Park JY, Kang SK, Kim YK: Ciglitazone induces caspase-independent apoptosis through down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res* 2008;33:551-561.
- 37 Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS: Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 2004;23:446-456.
- 38 Kim EH, Kim HS, Kim SU, Noh EJ, Lee JS, Choi KS: Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 2005;24:6877-6889.
- 39 Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, Lu GC: Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2005;12:509-514.
- 40 Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Koller E, Pinilla C, Vassilev LT, Reed JC, Andreeff M: Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML. *Blood* 2010;115:306-314.
- 41 Mohapatra S, Chu B, Zhao X, Pledger WJ: Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:7717-7723.
- 42 Vaughn AE, Deshmukh M: Essential post-mitochondrial function of p53 uncovered in DNA damage-induced apoptosis in neurons. *Cell Death Differ* 2007;14:973-981.
- 43 Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK, Cheng JQ: Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 2004;279:5405-5412.
- 44 Shingu T, Yamada K, Hara N, Moritake K, Osago H, Terashima M, Uemura T, Yamasaki T, Tsuchiya M: Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells. *Cancer Res* 2003;63:4044-4047.

Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) knock down

Patricia L. C. Lopez^{1,2}, Eduardo C. Filippi-Chiela^{1,2}, Andrew O. Silva^{1,2}, Elvira A. A. Cordero^{1,2}, Daniel Garcia-Santos³, Alessandra L. Pelegrini^{1,2}, Gleice M. Reder⁴, Nicolle L. Barbieri^{1,2}, Guido Lenz^{1,2*}

Supplementary Material and Methods File

Western Blot Analysis

Glioma cell cultures were lysed and prepared for western blotting as previously described [22]. The membranes were incubated overnight with primary antibodies against XIAP, Caspase-3 (8G10), p27, p53 (1:500; Cell Signalling); Survivin (1:500; R&D Systems). Incubation of all of the primary antibodies was followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary (1:2000; Cell Signaling) for 2h at 4°C. Chemoluminescence was detected by X-ray films (Kodak X-Omat, rochester, NY). Band density was analysed using Image J software (NIH).

Population Doubling

Cells were plated at 0.5×10^3 cell/well in 96well plate and treated for 10 days with renewal of medium treatment every 48 h, when cells were passaged and counted in cytometer. Data was analyzed using the formula $PD = [\log(A) - \log(B)] / \log(2)$; where A is number of cells per well at time of passage and B is the number of cells seeded at the previous passage. The sum of PDs was then plotted against time of culture.

Metabolic Viability Assay

To evaluate metabolic viability, MTT Assay (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) was performed after 48 h of drug treatment. Cells were incubated with MTT solution (2.5 µg/mL, final) in CMF (Calcium and Magnesium Free saline solution) for 2.5 h under cell culture conditions. After MTT solution was removed, DMSO was added to dissolve

formazan crystals and measured the absorbance at at 560 nm and 630 nm using a microplate reader and SoftMax Pro software. Values from the 560 nm absorbance was subtracted from 630 nm absorbance for each sample. Cell treatment with drug vehicle was considered 100% of viability.

Annexin-V Staining

Floating and adherent treated cell were collected and incubated in 100 μ L of Staining Buffer together with 0.5 μ L of solution with Annexin V-FITC (Gibco/Invitrogen) plus 0.2 μ L and Propidium Iodide (2 mg/mL) for 15 minutes at room temperature. For all cytometry experiments, ten thousand events were acquired on a FACSCalibur using CellQuest software (Becton-Dickinson). Data was analysed in WinMDI 2.9 Software.

Cell Cycle Analysis

Cells were plated at 2×10^4 cells per well in a 24-wells plate, followed by treatments as indicated. After the indicated times, cells were trypsinized and centrifuged twice at 2000 rpm for 6 minutes, washed with PBS and then resuspended in 100 μ L of phosphate-buffered saline (PBS). Cells were fixed by addition of ice-cold ethanol 70% (v/v in PBS) at 4°C for at least 2 h. Fixed cells were washed with PBS and marked with a solution containing 50 μ g/ml PI, 0.1% Triton X-100 and 50 μ g/mL RNase for 30 min, in the dark, at room temperature. Marked cells were analyzed using a flow cytometer FACSCalibur to evaluate DNA content of cells and, thus, cell cycle distribution of samples.

Caspase Assay

After treatment, cells were washed with PBS and lysed with Triton X-100 0.2% in PBS 100 mM HEPES pH 7.5 for 10 min on ice. After centrifugation at 10,000g for 10 min, protein concentration in cell extracts was estimated using BCA Protein Assay Reagent (Pierce); cell extracts (40 μ g protein) were incubated with 20 μ M caspase synthetic substrates (Peptide Institute) Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA for caspase-3/7 in 100 mM HEPES–NaOH, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1 mg/ml BSA, and 10 mM DDT (200 μ l of final volume). Substrate hydrolysis was monitored for 2 h at 370 nm excitation/460 nm emission in a microplate

fluorescence reader (Molecular Devices Corporation) equipped with a software module for kinetic analysis (SOFTMax PRO, Molecular Devices, Sunnyvale, USA); substrate hydrolysis was quantified by comparison with a standard curve (for MCA substrates).

Senescence Associated to β -Galactosidase (SA- β -GAL)

PBS was used for washing the cells, 4 % paraformaldehyde for fixation and a solution containing 1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM acid citric / sodium phosphate, pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride and 2 mM magnesium chloride. To stain the nucleus, we used a solution containing 0.1 % Triton X-100, 300 mM DAPI and 1 X PBS. After drug treatment cells were washed with PBS, and incubated with 4 % paraformaldehyde for 1 h. Cells were incubated with β -galactosidase solution (1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM acid citric / sodium phosphate, pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride and 2 mM magnesium chloride) for 6 h.

Supplementary Figures

Fig. 1S. Effect of XIAP stable knockdown in cell growth. Aspect of U87 XIAP KD cell **(A)**. Cumulative Population Doubling of U87 XIAP KD cell (shX) and wild type (WT) cells cultivated for 10 days **(B)**. Phase contrast image of cell treated for 48 h with doxorubicin (Doxo) 1 μ M and vincristine (Vinc) 100 nM **(C)**.

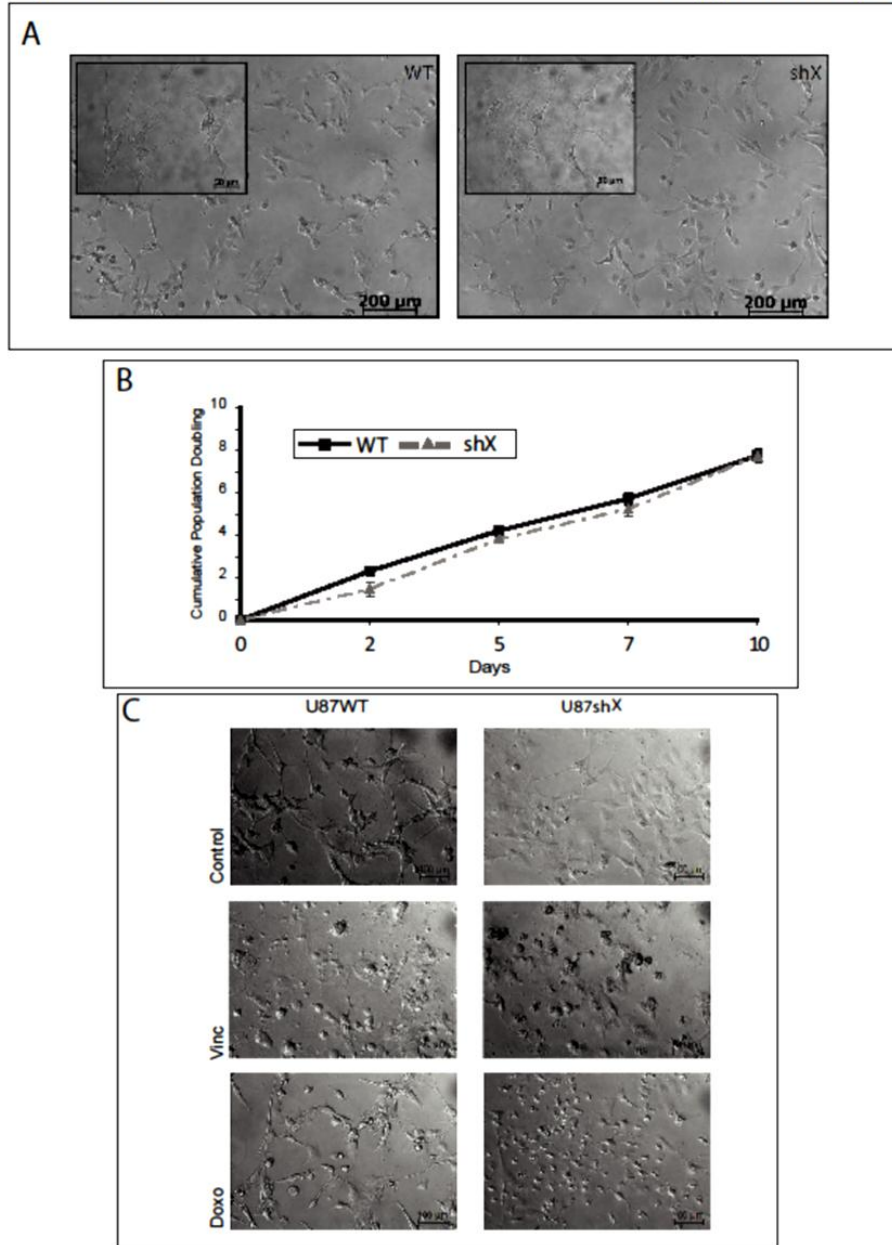


Fig. 25. Drug sensitivity of XIAP KD U87 cells. Cell viability was measured with MTT after 48 h of treatments with taxol 10 and 20 nM (A); BCNU 100 nM - 100 μ M (B); temozolomide 100 and 300 μ M (C); quercetin 100 nM - 100 μ M (D); cisplatin 1.6 - 16 μ M (E); etoposide 100 nM - 100 μ M (F); resveratrol 10 - 100 μ M (G); vincristine 10nM - 1 μ M (H); doxorubicin 1 - 100 μ M (I). The results

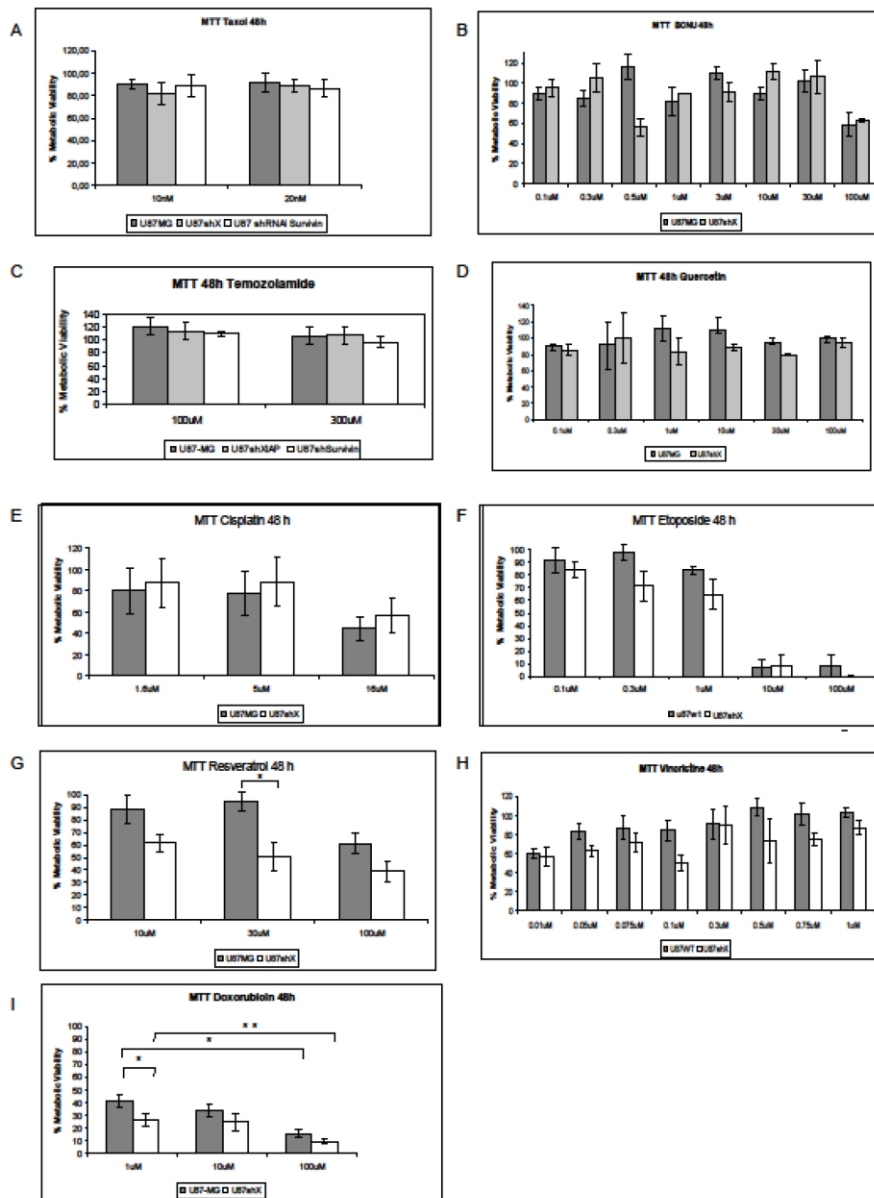


Fig. 3S. Drug sensitivity of XIAP KD U251 cells. Western blot confirming the knockdown of XIAP in U251 cell line (A). Cell viability was measured with MTT after 48 h of treatments with doxorubicin (B) at the indicated concentrations. The results represent average \pm SEM from three independent experiments

Lopez et al.,

Supplementary 3.

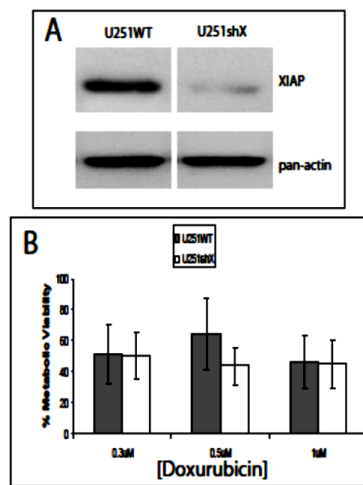


Fig. 4S. DNA damage induced by doxorubicin and vincristine. Doxorubicin and vincristine induce apoptosis and necrosis in XIAP KD cells. Annexin-FITC/PI analysis of U87 WT and shX cells treated for 48 h with the indicated treatments and quantification apoptosis (Annexin positive, PI negative) and necrosis (Annexin negative and PI positive) **(A)**. γ H2AX Western blot indicates DNA damage after Doxorubicin 48 h treatment doxorubicin (Doxo) 1 μ M and vincristine (Vinc) 100nM. Loading control (LC) represents PVDF membranes stained with comassie blue **(B)**. Relation of DNA damage shX/wt by Comet assay after 1 h and 12 h of treatment with doxorubicin (Doxo) 1 μ M and vincristine (Vinc) 100 nM **(C)**.

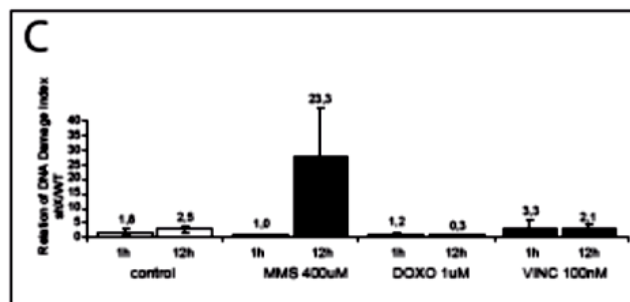
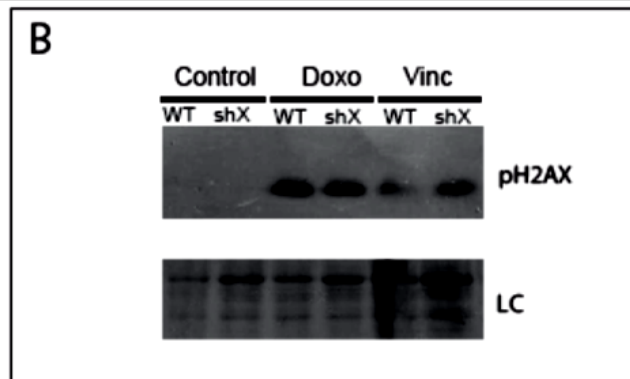
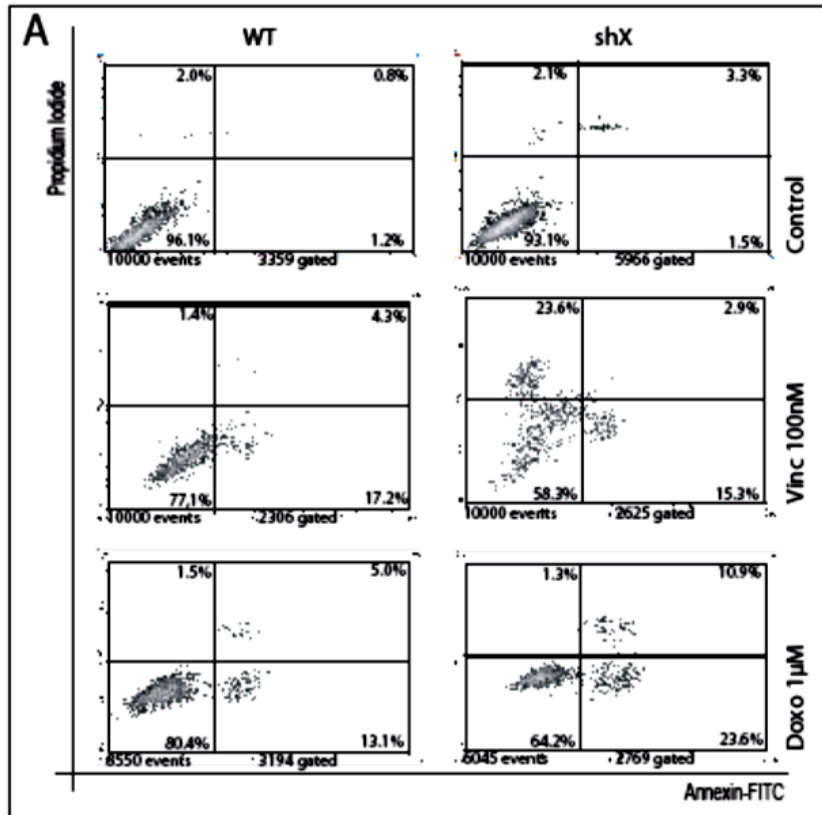
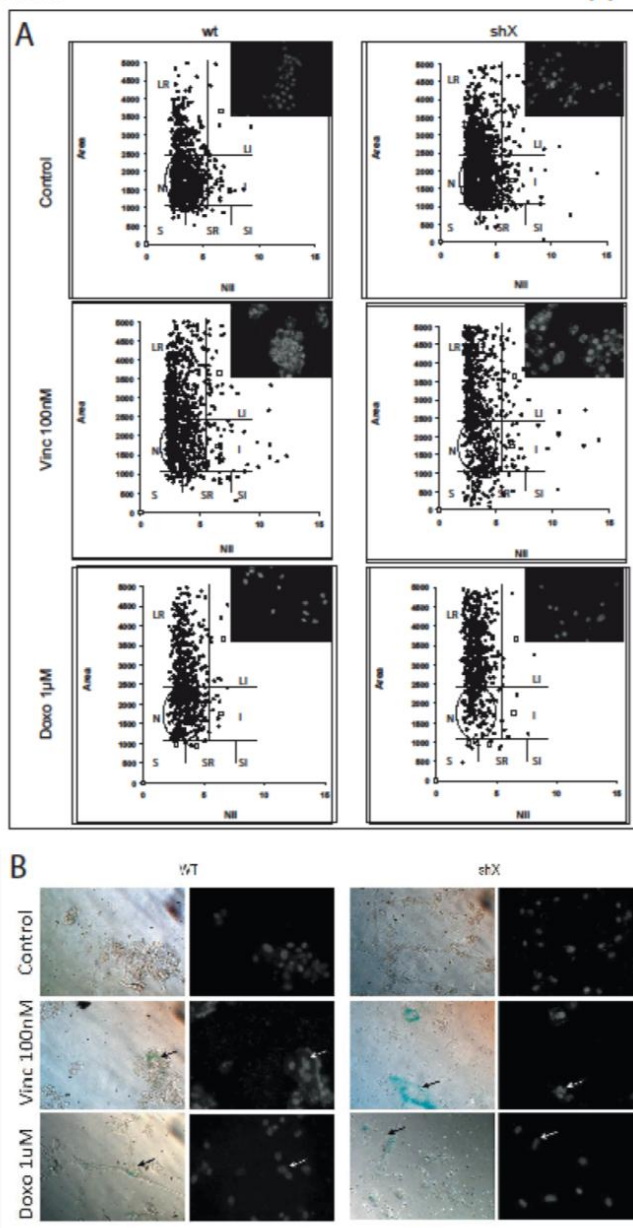


Fig. 5S. Doxorubicin and Vincristine induce senescence in XIAP KD cells. Doxorubicin and vincristine affect nuclear morphology. Morphometric Nuclear Analysis of U87MG cells after 48 h of treatment with doxorubicin (Doxo) 1 μ M and vincristine (Vinc) 100 nM. The area (in pixels) and Nuclear Irregularity Index (NII) of each nucleus were measured from DAPI images. Graphic regions indicate nuclear morphological characteristic: Normal (N); Small (S); Small and Regular (SR); Large and Regular (LR); Irregular (I). Nuclear morphometry differ in treated cells (A). Senescence assay (SA-b-gal) of treated cells. Black arrow indicates senescent cell (blue). White arrow indicates nucleus DAPI-stained nuclei of senescent cells (B).

Lopez et al.

Supplementary 5.



Capítulo III

O manuscrito a seguir, *“Temozolomide and Doxorubicin, their different effects on human glioblastoma cancer stem cell”* será submetido à *Molecular Cancer* no formato de short communication. Este trabalho tem autoria compartilhada com Emily Schlee Villodre e consta na dissertação de mestrado da mesma. Minha participação compreendeu a revisão da escrita do artigo, em parte dos experimentos vinculados a doxorubicina. As figura 1D e figura suplementar 1B foram exclusivamente realizadas por mim.

ARTIGO CIENTÍFICO (escrito em forma de *short communication* para *Molecular Cancer*)

Human glioblastoma cancer stem cells are sensitive to Doxorubicin and Temozolomide

Emilly Schlee Villodre ^{1&}, Patrícia Luciana da Costa Lopez ^{1&} and Guido Lenz ^{1 *}

¹Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

[&]Both authors contributed equally to this work

ESV: emillyvillodre@gmail.com

PLCL: patilu17@yahoo.com.br

GL: lenz@ufrgs.br

*Corresponding author: Professor Guido Lenz

Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431, sala 115, Campus do Vale, CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: 55.51.33087620

Email address: lenz@ufrgs.br

Abstract

Background: Gliomas are aggressive brain tumors and the cell line U87 produces tumor-spheres enriched in cancer stem cells (CSCs) that are important for the establishment and maintenance of tumor mass, and studies showed they are more resistant to traditional therapies than differentiated cells. Temozolomide (Tmz) is a DNA methylating agent and doxorubicin (Doxo) is a topoisomerase inhibitor and also form DNA adducts. Our objective was to evaluate the effects of these drugs on CSCs derived from human glioblastoma.

Findings: Using DMEM/FBS, Doxo 1 and 10 nM reduced the number of spheres and induced cell senescence in the cell line U87 after 7 days. Doxo 10 nM decreased the number of Nanog and Oct4 positive cells while Doxo 1 nM had no effect. Tmz 5 μ M decreased the number of spheres and the CSCs markers. Using the specific medium for CSCs, we observed that all treatments reduced the sphere formation after 7 days.

Conclusions: Our results indicate that low doses of Doxo have an effect against CSCs besides induces cell senescence in the remaining cells. Tmz had a similar effect except that did not induce cell senescence. The response obtained using sublethal doses is an important condition to therapeutic approach, which could lead to a reduction on side effects.

Key words: gliomas, cancer stem cells, temozolomide, doxorubicin, senescence.

Findings

Glioblastomas (GBM) are most common primary Central Nervous System (CNS) tumors that are characterized by its aggressiveness, highly invasiveness and recurrence [1]. GBMs are chemo and radioresistant and the average survival is around 9 to 12 months after first diagnosis [1-5].

GBM present heterogeneous cell populations [6-8] and among them the cancer stem cells (CSCs) that are fundamental for tumor growth and resistance presenting features of normal stem cells [9-12]. They are capable of self-renewing and unlimited proliferation [9, 10, 13]. Recent studies indicated that the increased expression of repair enzymes in CSCs might be responsible for the high resistance in gliomas and the higher aggressiveness of recurrences, due to an increase in the proportion of CSCs [14-16]. The gliomas cell line U87 when in high confluence in culture forms tumor-spheres. Studies demonstrated that these tumor-spheres are rich on CSCs (Zhuang, 2011; Ledur, 2011). Therefore, quantification of the number of spheres formed is an indicative of the presence of CSCs.

Senescent cells enter in an irreversible growth arrest in G1 phase of cell cycle; these cells present a different morphology than those other cells in culture, being larger, flat and vacuolated; high activity of the enzyme β -galactosidase; and overexpression of several cell cycle inhibitory proteins [17-21]. Senescence can be induced by high number of cell divisions [17], oncogene expression, tumor suppressor gene inactivation or genotoxic stress [22-24].

Temozolomide (Tmz) is the most widely used chemotherapy in the treatment of patients with GBM [25, 26]. Tmz acts by adding a methyl group at the O⁶ position of guanine, generating a misleading matching with thymine [25-27]. Studies correlating Tmz with CSCs are contradictory. Beier *et al.*, in 2008, showed that Tmz preferentially reduced

cancer stem cell population, whereas Bleau *et al.*, in 2009, have observed an increase in tumorigenicity of CSCs [25, 28].

Doxorubicin (Doxo) not only acts forming DNA adducts but also inhibiting topoisomerase.

Doxo is used to induce DNA damage and apoptosis in several tumors [29-32]. A

melanoma study shows doxorubicin resistance in cells with co-expression of ABCB5 (drug efflux system) and CD133 (a marker of multiple stem cells in human skins) [33, 34].

In this study we show that using sublethal doses of Doxo and Tmz decrease the CSCs population. In addition, Doxo induced cell senescence in the cells remaining.

Doxorubicin or Temozolomide reduce glioma CSCs

Doxorubicin has an IC50 in the range of low to medium μM in several cell lines, including gliomas when measured with classical cytotoxicity assays with 2 to 3 days of treatment [35, 36]. Surprisingly, we observed effects on sphere formation assay with three orders of magnitude less drug doxo IC50 when treated for 7 days, both in serum containing and in Stem Cell Medium (SCM) (Figure 1A and 1B).

Although spheres are used as an indication of the proportion of CSCs *in vitro*, it was recently demonstrated that cells not in spheres retain tumorigenicity [37, 38]. Analysis of CSCs markers, Oct4 and Nanog showed that Doxo 10 nM, but not 1 nM reduced the proportion of cells positive for these CSC markers (Figure 2A and B). Interestingly, Tmz, also in a sublethal dose of 5 μM , reduced the proportion of cells positive to these markers (Figure 2), despite having a smaller effect on sphere formation than Doxo 10 nM (Figure 1).

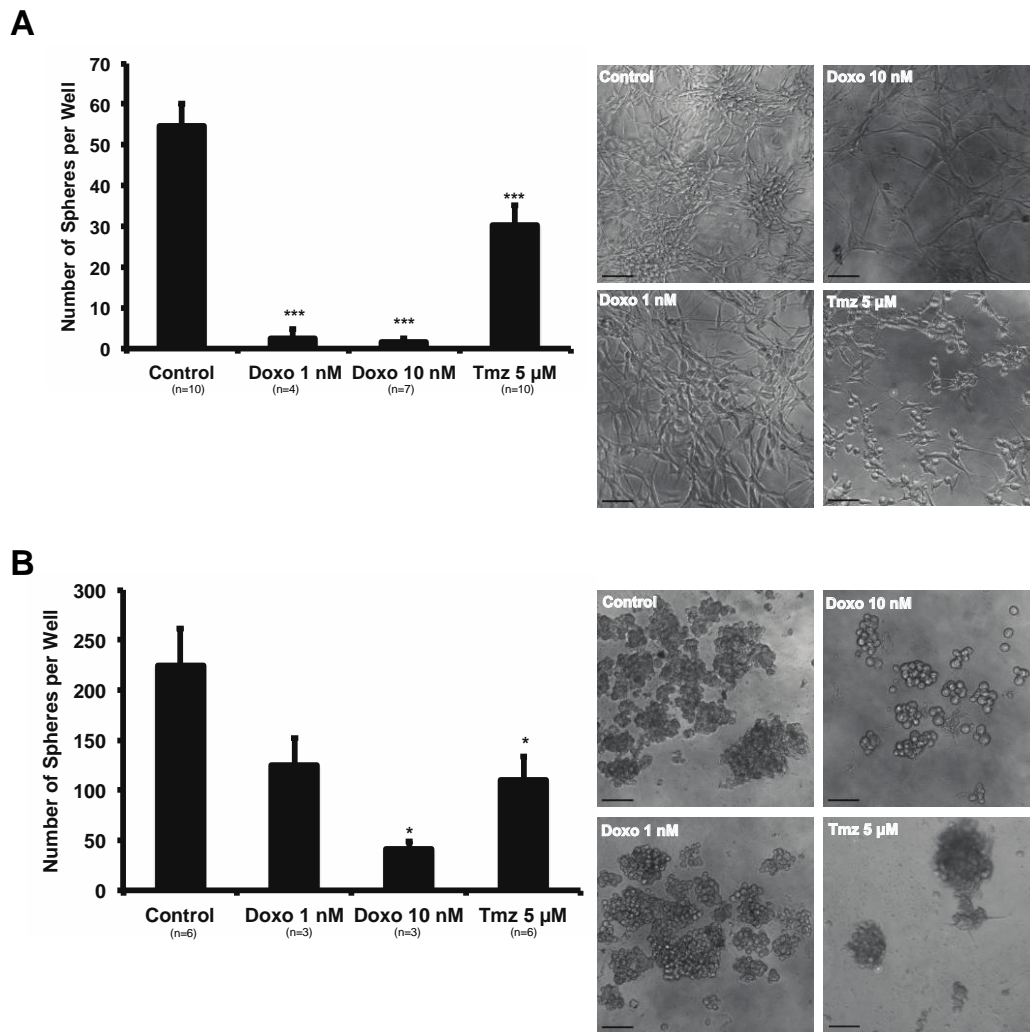


Figure 1. Treatment with low doses of Doxorubicin and Temozolomide reduce the number of spheres formed.

U87 cells were plated using DMEM 5 % FBS (A) or Neural Stem Cell Medium (SCM) (B) and treated with Doxorubicin (Doxo) or Temozolomide (Tmz) as indicated; on day 4 the medium was changed and new drugs were added; on day 7, number of spheres was counted; representative images of spheres after 7 days of treatment. Scale bar: 100 μm.

Results represent the mean (± SEM); * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

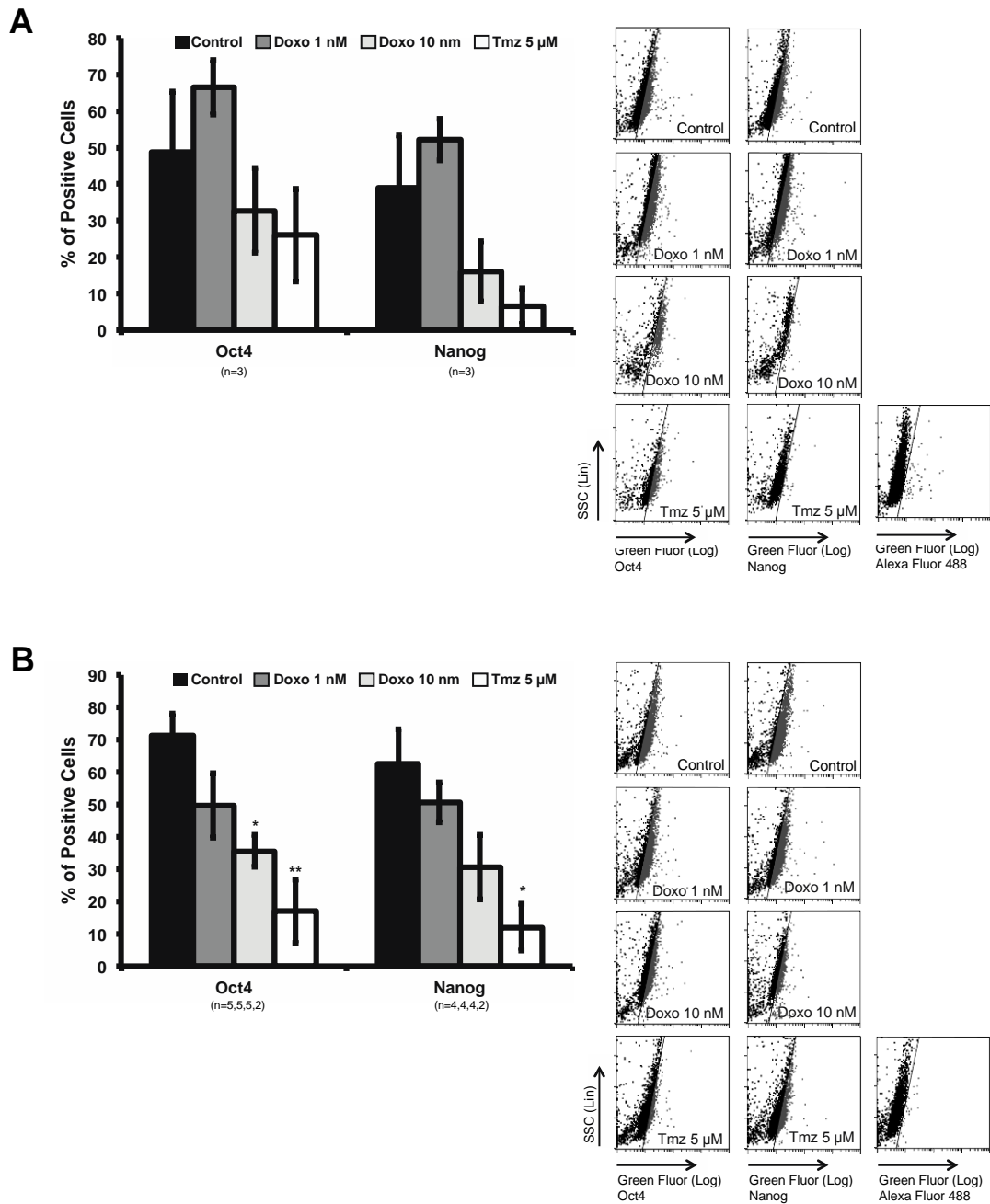


Figure 2. Doxorubicin 10 nM and Temozolomide 5 μ M decrease the percentage of CSCs markers.

Proportion of Oct4 and Nanog positive cells was evaluated by flow cytometry in U87 grown on 10% FBS (A) or Stem Cell Medium (SCM) (B) after treatment with Doxorubicin (Doxo) or Temozolomide (Tmz) as indicated; representative plots of each treatment.

Results represent the mean (\pm SEM); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Chronic treatments may induce cell senescence. We observed that Doxo treatment increased the β -galactosidase staining as well as increased the size of the nuclei, another indication of senescence. Interestingly, Tmz did not induce senescence features when treated for 7 days (Figure 3A and Figure S1).

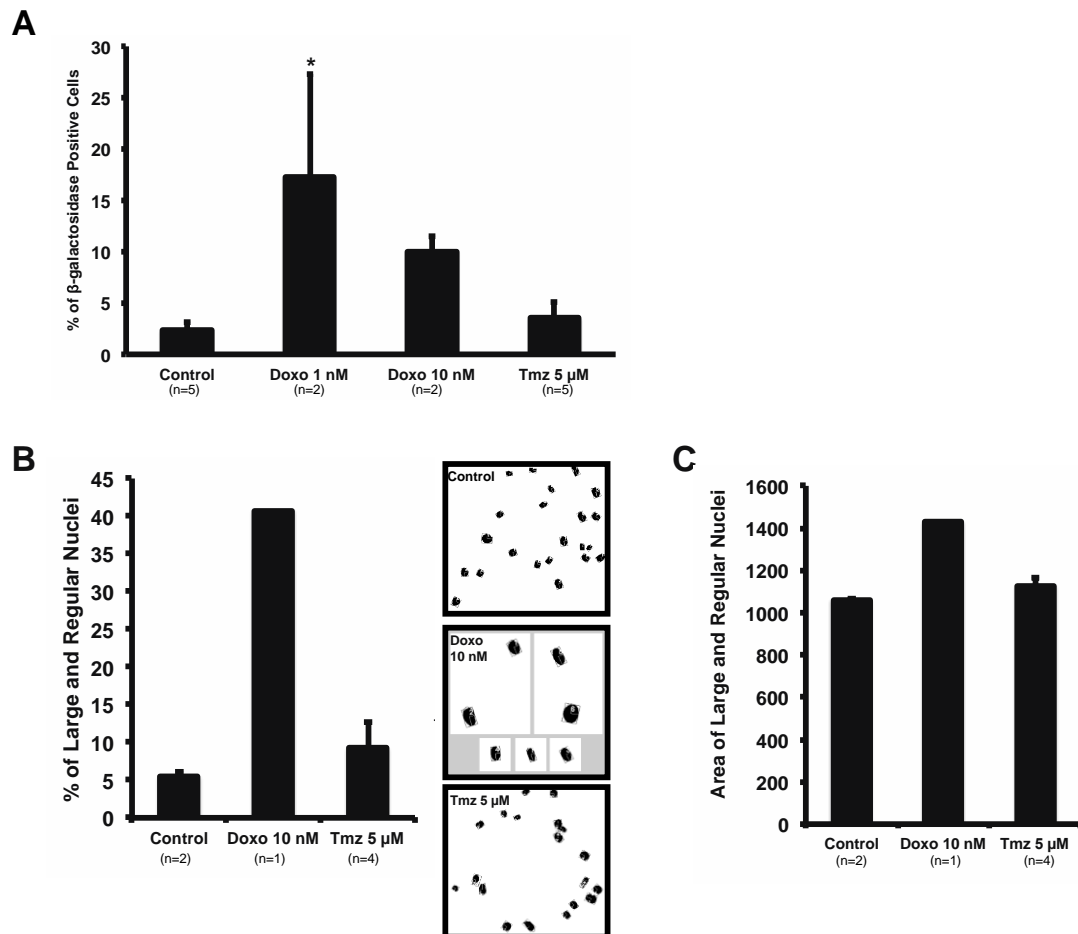


Figure 3. Senescence is increased after treatment with Doxorubicin but not with Temozolomide

A. Percent of β -galactosidase positive cells in U87 with Doxorubicin (Doxo) or Temozolomide (Tmz), as indicated, on 5 % FBS quantified using ImageJ. **B.**

Morphometric Nuclear Analysis (MNA) after treatment with Doxo 10 nM and Tmz 5 μ M grown on 5 % FBS. Graphic show the quantification of Large and Regular (LR) nuclei as

an indication of senescence induction. Representative images of nuclei. Image of Doxo 10 nM represent cells from the same field. C. MNA after treatment with Doxo 10 nM and Tmz 5 μ M grown on 5 % FBS. Graphic show the average of area derived from large and regular nuclei. Results represent the mean (\pm SEM); * $p < 0.05$.

Doxorubicin is unable to efficiently cross the brain blood barrier (BBB), which may have reduced the interest in studying the effect of this drug in gliomas [39, 40]. However local delivery of this drug with biodegradable polymers or drug eluting beads have improved the survival of rat with gliomas [31, 41]. Additionally, rats harboring an intracranial implant of U251 or U87 cells presented an increased survival when treated with polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin [42]. Furthermore, the recent description of glioma tumor endothelial cells can be derived from cancer stem cells and that elimination of these cancer-derived endothelial cells present a good therapeutic result [43] suggest that drugs may not have to cross the BBB in order to have anti-glioma therapeutic effects. The important aspect of the present study is the very low concentrations needed to reduce stem cell markers in glioma cultures, suggesting that even if only a fraction of doxorubicin reaches the tumor, this could still have an effect on the CSC population and therefore a therapeutic effect.

Studies about the effect of Tmz on CSCs are still contradictory. 15 or 500 μ M of Tmz for 14 days reduced sphere formation and proportion of CD133⁺ in primary cultures of gliomas [25], which was also shown for cell lines with 200 μ M of Tmz in another study [44]. However, Liu *et al.* found CD133⁺ cells to be more resistant to 48 h treatment with Tmz at concentrations from 0.2 to 2 mM [45]. Chronic treatments are more representative of real therapeutic treatments, in which Tmz is given in several sessions. Our data supports

the hypothesis that glioma CSCs are more sensitive to Tmz and this may be one of the reasons for its relative success.

Taken together our results indicate that doxorubicin at 10 nM decreased the percentage of CSCs markers, reducing the CSCs population and also increased cell senescence, thereby decreasing the proliferation of the remaining cells. Tmz had a similar effect produced by Doxo, And because of the low doses used and the effect achieved, Doxo may be potentially used clinically for the treatment of gliomas.

List of Abbreviations

CSCs: cancer stem cells; *Doxo*: doxorubicin; *FBS*: fetal bovine serum; *GBM*: glioblastoma; μM : micro molar; $\mu mol / L$: micro molar per liter; *nM*: nano molar; *NMA*: Nuclear Morphology Analysis; *NSCM*: neural stem cell medium; *Oct4*: Octamer 4; *Tmz*: temozolomide.

Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contribution

ESV and PLCL designed and performed the experiments; ESV, PLCL and GL wrote the manuscript; ESV, PLCL and GL performed data analysis; all authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank the financial support by CNPq, CAPES and FAPERGS. Felipe Almeida Sassi for reviewing the text.

Reference List

1. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA: **Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter.** *Genes Development* 2001, **15**:1311-1333.
2. Bredel M, Zentner J: **Brain-tumour drug resistance: the bare essentials.** *Lancet Oncology* 2002, **3**:397-406.
3. Holland EC: **Gliomagenesis: Genetic Alterations and Mouse Models.** *Nature Reviews* 2001, **2**:120-129.
4. Louis DN: **Molecular Pathology of Malignant Gliomas.** *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2006, **1**:97-117.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: **The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.** *Acta Neuropathology* 2007, **114**:97-109.
6. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP: **CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles.** *Cancer Research* 2007, **67**:4010-4015.
7. Fan X, Salford LG, Widegren B: **Glioma stem cells: evidence and limitation.** *Seminars in Cancer Biology* 2007, **17**:214-218.
8. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS: **Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme.** *Oncogene* 2004, **23**:9392-9400.
9. Clarke MF, Fuller M: **Stem cells and cancer: two faces of eve.** *Cell* 2006, **124**:1111-1115.
10. Denysenko T, Gennero L, Roos MA, Melcarne A, Juenemann C, Faccani G, Morra I, Cavallo G, Reguzzi S, Pescarmona G, Ponzetto A: **Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies.** *Cell Biochemistry and Function* 2010, **28**:343-351.

11. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB: **Cancer stem cells in nervous system tumors.** *Oncogene* 2004, **23**:7267-7273.
12. Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A: **Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells.** *Glia* 2009, **57**:724-733.
13. Nern C, Sommerlad D, Acker T, Plate KH: **Brain tumor stem cells.** *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2009, **171**:241-259.
14. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.** *Nature* 2006, **444**:756-760.
15. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R: **Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells.** *Cell Death and Differentiation* 2006, **13**:1238-1241.
16. Kang MK, Kang SK: **Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma.** *Stem cells and Development* 2007, **16**:837-847.
17. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al: **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**:9363-9367.
18. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati J-B, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O: **Induction of Replicative Senescence Biomarkers by Sublethal Oxidative Stresses in Normal Human Fibroblast.** *Free Radical Biology & Medicine* 2000, **28**:361-373.
19. Lundberg AS, Hanhn WC, Gupta P, Weinberg RA: **Genes involved in senescence and immortalization.** *Current Opinion in Cell Biology* 2000, **12**:705-709.

20. Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F: **Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts.** *Molecular Biology of the Cell* 2002, **13**:2502-2517.
21. Reddy JP, Li Y: **Oncogene-induced senescence and its role in tumor suppression.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2011, **16**:247-256.
22. Braig M, Schmitt CA: **Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development.** *Cancer Research* 2006, **66**:2881-2884.
23. Chandeck C, Mooi WJ: **Oncogene-induced Cellular Senescence.** *Advances in Anatomic Pathology* 2010, **17**:42-48.
24. Wyndford-Thomas D: **Cellular Senescence and Cancer.** *The Journal of Pathology* 1999, **187**:100-111.
25. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, et al: **Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma.** *Cancer Research* 2008, **68**:5706-5715.
26. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al: **Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.** [*The New England Journal of Medicine*](#) 2005, **352**:987-996.
27. Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S: **Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting.** *Protein & Cell* 2010, **1**:638-655.
28. Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC: **PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:226-235.
29. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR: **The power and potential of doxorubicin-DNA adducts.** *IUBMB Life* 2005, **57**:73-81.
30. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T: **Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa**

- upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells.** *Oncogene* 2008, **27**:741-754.
31. Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H: **Local Delivery of Doxorubicin for the Treatment of Malignant Brain Tumors in Rats.** *Anticancer Research* 2005, **25**:3825-3831.
 32. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.** *Pharmacological Reviews* 2004, **56**:185-229.
 33. Zheng X, Cui D, Xu S, Brabant G, Derwahl M: **Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: Characterization of resistant cells.** *International Journal of Oncology* 2010, **37**.
 34. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH: **ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma.** *Cancer Research* 2005, **65**:4320-4333.
 35. Lopez PLC, Filippi-Chiela EC, Silva AO, Cordero EAA, Garcia-Santos D, Pelegrini AL, Reder GM, Barbieri NL, Lenz G: **Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) knock down.** *Oncology* 2012, **submitted**.
 36. Kondo S, Kondo Y, Kaakaji R, Peterson J, Morimura T, Takeuchi J, Barnett G: **mdm2 gene mediates the expression of mdrl gene and P-glycoprotein in a human glioblastoma cell line.** *British Journal of Cancer* 1996, **74**:1263-1268.
 37. Barrett LE, Granot Z, Coker C, Iavarone A, Hambardzumyan D, Holland EC, Nam HS, Benezra R: **Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma.** *Cancer Cell* 2012, **21**:11-24.
 38. Read TA, Wechsler-Reya RJ: **Spheres without Influence: Dissociating In Vitro Self-Renewal from Tumorigenic Potential in Glioma.** *Cancer Cell* 2012, **21**:1-3.

39. von Holst H, Knochenhauer E, Blomgren H, Collins VP, Ehn L, Lindquist M, Norén G, Peterson C: **Uptake of Adriamycin in Tumour and Surrounding Brain Tissue in Patients with Malignant Gliomas.** [*Acta Neurochirurgica*](#) 1990, **104**:13-16.
40. Almubarak M, Newton M, Altaha R: **Reinduction of bevacizumab in combination with pegylated liposomal Doxorubicin in a patient with recurrent glioblastoma multiforme who progressed on bevacizumab/irinotecan.** *Journal of Oncology* 2008, **2008**:942618.
41. Baltés S, Freund I, Lewis AL, Nolte I, Brinker T: **Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: a pilot study in a rat model.** [*Journal of Materials Science: Materials in Medicine*](#) 2010, **21**:1393-1402.
42. Kikuchi T, Saito R, Sugiyama S, Yamashita Y, Kumabe T, Krauze M, Bankiewicz K, Tominaga T: **Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models.** *Journal Neurosurgery* 2008, **109**:867-873.
43. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R: **Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells.** *Nature* 2010, **468**:824-828.
44. Gilbert CA, Daou MC, Moser RP, Ross AH: **Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence.** *Cancer Research* 2010, **70**:6870-6879.
45. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS: **Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma.** *Molecular Cancer* 2006, **5**:67.

Additional Material

Additional file 1

Title: Supplementary information.

Description: Materials and Methods.

Additional file 2

Title: Figure S1.

Description: **A.** Representative images of β -galactosidase positive cells, showing positive cells in blue, of U87 treated with Doxo and Tmz as indicated on 5 % FBS. Scale bar: 50 μ m. **B.** Morphometric Nuclear Analysis after Doxo 10 nM and Tmz 5 μ M treatment. The area (in pixels) and Nuclear Irregularity Index (NII) of each nucleus were measured from DAPI images. Graphic regions indicate nuclear morphological characteristic: Normal (N); Small (S); Small and Regular (SR); Large and Regular (LR); Irregular (I).

Supplementary Information - Material And Methods

Cell Culture

The culture medium was prepared with DMEM Low Glucose (Gibco BRL), 44 mM NaHCO₃, 7.68 mM HEPES, 1 % penicillin and streptomycin (Gibco BRL), 0.1 % fungizone (Gibco BRL) supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS - Gibco BRL), with pH adjusted to 7.4. The culture medium specifically for Cancer Stem Cells (Stem Cell Medium – SCM) was prepared containing DMEM F12 (Gibco BRL), 14.28 mM NaHCO₃, 1 % penicillin and streptomycin, 0.1 % fungizone supplemented with 20 ng/ml FGF (Fibroblast Growth Factor, Sigma Chemical Co. - St. Louis, MO, USA), 20 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma), 10 ng/ml LIF (Leukemia Inhibitor Factor, Sigma) and B27 (Gibco, BRL) 0.1 x with pH adjusted to 7.4.

The human glioma cell line U87 was obtained from ATCC (American Type Culture Collection - Rockville, Maryland, USA). The cell line was grown in low glucose DMEM supplemented with fetal bovine serum or DMEM F12 supplemented with growth factors (FGF, EGF, LIF and B27), both containing antibiotics and fungicides.

Cells were maintained in tissue culture flasks at 37 °C with humidified atmosphere and 5 % CO₂. The culture medium was changed every 2 / 3 days.

Sphere Formation Assay

We used 96-well plate and DMEM Low Glucose supplemented with 5 % FBS or DMEM F12 with growth factors (SCM). The treatments were made containing different concentrations of Doxorubicin (Doxo - Sigma) or Temozolomide (TMZ - Sigma).

U87 Cells were trypsinised and counted in Neubauer chamber. 1.000 cells were plated containing the treatment or control using 6 wells of the 96-well plate for each treatment.

The concentrations used were Doxo 1 nM and 10 nM and Tmz 5 μ M. Control had the culture medium and vehicle used to dilute drugs (DMSO) at the same quantity as in treatments.

The quantification of sphere was analyzed using an optical microscope of 4-7 days, in which the number of spheres was counted. Spheres were considered cells that formed a group, which were not fully adhered when observed in phase contrast.

Determination of Protein

After the seventh day of treatment at sphere formation assay, two wells of the control or treatment were lysed with a solution containing SDS 10 %, EDTA 200 mM and Tris 500 mM for 10 minutes. The supernatant was collected and boiled for 5 minutes. The dosage of proteins was performed using the BCA Protein Assay Kit (Pierce) and after 30 minutes of incubation with the solution, samples were read using the SpectraMax spectrophotometer (MolecularDevices, CA, USA) at a wavelength of 562 nm. The dosage was used to correct the number of spheres, using the formula: number of spheres / amount of protein.

Flow Cytometry

For flow cytometry was used a solution containing 0.5 g BSA in 100 ml of PBS (Incubation Buffer) and primary antibodies Oct4 (Cell Signal) and Nanog (Cell Signal) and the secondary antibody Alexa 488 (Cell Signal).

The cells were fixed with 4 % formaldehyde for 10 min at 37 °C. After, they were permeabilized with 90 % methanol for 30 min on ice. The cells were immunostained with each primary antibody 1:200 for 2 h 30 min. Washed two times with the incubation buffer and after the secondary antibody 1:1000 was added for 1 h 30 min. The cells were analyzed by flow cytometry by detecting the green fluorescence emitted by the antibody.

The results were evaluated using the software CytosoftPCA96 (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) and WinMDI2.9.

Senescence Associated to β -Galactosidase (SA- β -GAL)

PBS was used for washing the cells, 2 % paraformaldehyde for fixation and a solution containing 1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM acid citric / sodium phosphate, pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride and 2 mM magnesium chloride.

To stain the nucleus, we used a solution containing 0.1 % Triton X-100, 300 mM DAPI and 1 X PBS.

After the seventh day of the sphere formation assay, two wells of control and each treatment were washed with PBS, and 2 % paraformaldehyde was added for 1 h. Then cells were washed again and added to 50 μ l of solution containing the β -galactosidase substrate, X-Gal, for 6 h.

After this period, cells were washed with PBS and added 50 μ l of a solution of marking core (containing Triton X-100, PBS and DAPI) for 15 min.

After the photos were obtained using inverted fluorescence microscope Carl Zeiss and the images were analyzed using the software ImageJ 1.42q.

Nuclear Morphology Analysis

The DAPI staining used for quantifying the cell senescence was also used to quantify the images using the Software Image Pro Plus 6.0 (IPP6 - Media Cybernetics, Silver Spring, MD). The parameters roundness, aspect, radius ratio and area box were quantified and grouped in an index, named Nuclear Irregularity Index (NII), which is composed by the sum of aspect, radius ratio and roundness, subtracted by the value of area box. Data

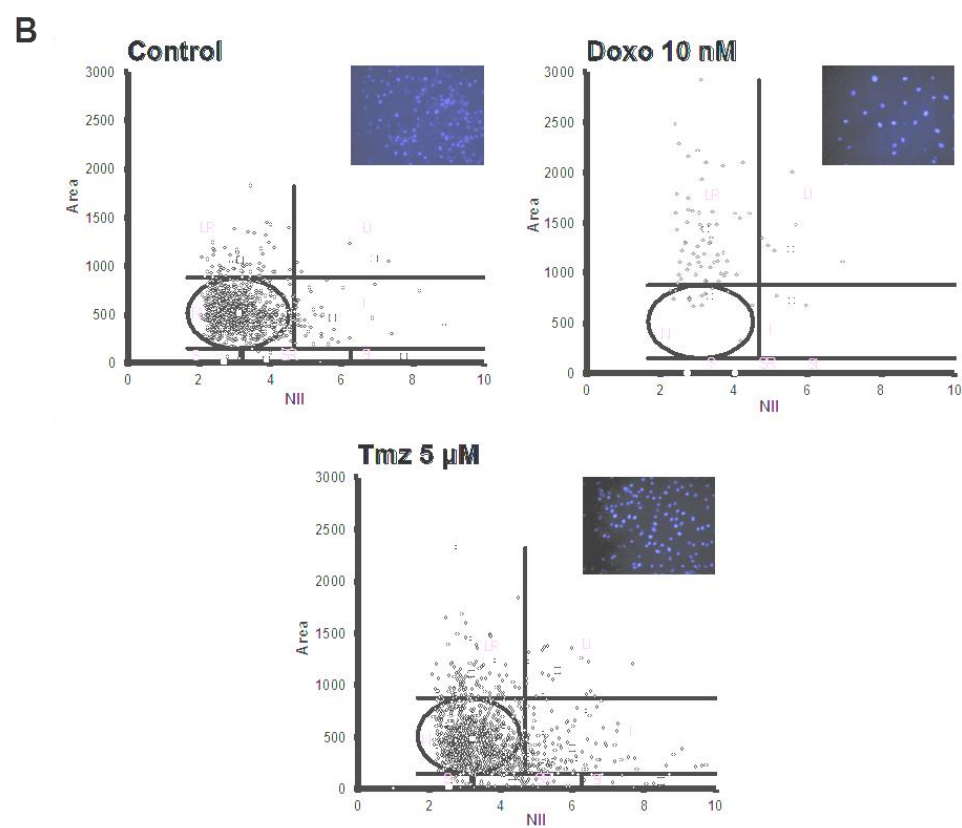
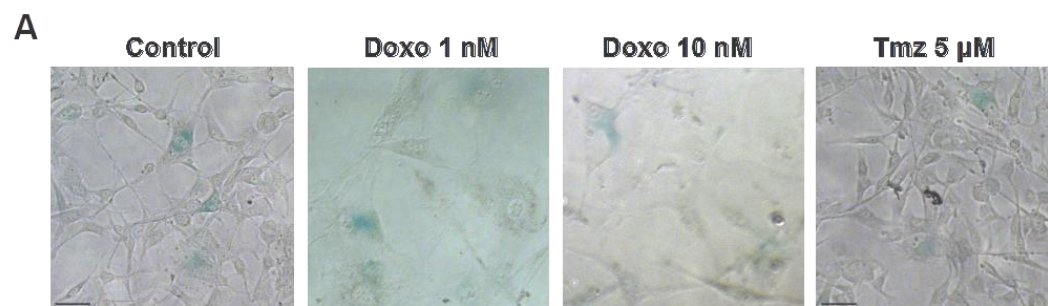
presented as a plot of Area versus NII in which normal nuclei were considered the nuclei inside 2 standard deviations (SD) of the mean of a population of nuclei obtained from untreated cells. Nuclei were considered large and regular if above 2 SD of size and below 3SD of NII and irregular when above 3SD of the large population or above 5 SD of the normal sized population.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using ANOVA followed by SNK for multiple comparisons.

Data analysis was performed with the aid of the GraphPad INSTAT (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Supplementary Information - Figure S1



Capítulo IV

Doxorrubicina e Silenciamento de XIAP ou Survivina em células tronco Tumorais de U87-MG

Introdução

Glioblastomas multiformes (GBM) são os tumores agressivos e bastante heterogêneos que apresentam uma população de células tronco tumorais (CSC – cancer stem cells) (Yuan, 2004; Fan, 2010; Beier, 2011) que parecem contribuir para resistência dos tumores a tratamentos (Singh, 2004; Clarke, 2006; Du, 2009; Denysenko, 2010). A formação de tumor-esferas, presentes na linhagem de glioma U87-MG, está associada a presença de CSC e malignidade do tumor (Yu, 2008), ainda que em outros estudos mais recentes demonstrem o oposto com o uso de diferentes marcadores (Barrett, 2012).

A resistência a apoptose é um dos principais mecanismos de surgimento, manutenção e resposta a quimioterápicos entre os tumores agressivos de difícil tratamento. Entre os membros da família das proteínas IAPs, XIAP (Ferreira, 2001; Carter, 2003; Schimmer, 2004) e survivina (Ambrosini, 1997; Vucic, 2000; Hunter, 2007; Augello, 2009) aparecem com frequência altamente expressas em tumores como gliomas.

Assim, os silenciamento de XIAP e survivina são alvos importantes no desenvolvimento de novas terapias para gliomas. Através do uso de vetores lentivirais, foi possível expressar estavelmente XIAP e survivina (separadamente) na linhagem de gliomas humano U87-MG. A combinação do silenciamento de

uma das IAPs com os fármacos temozolamida e doxorrubicina foi usada para avaliação do efeito na população tronco tumoral nas linhagens de gliomas.

Metodologia

Ensaio Clonogênico

100 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas por 48 horas com 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1µM de DOXO; 1 nM, 10 nM de VINC e 5 nM, 10 nM e 100 nM de TMZ. Após o tratamentos as células foram mantidas por 10 dias com troca de meio a cada 2 dias. Ao final dos 10 dias as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

Outras metodologias pertinentes a esse capítulo já foram descritas nos capítulos anteriores.

Resultados e Discussão

Os efeitos dos tratamentos 48 horas analisados em estudo anterior por MTT mostraram que em longo prazo há drástica redução da proliferação celular, nos quais não foi observada formação de colônias em células WT e silenciadas. Com doses menores, foi possível observar que não houve diferença dentre as células WT e as linhagens shS, mas que shX parecem ter adquirido resistência na ausência dos quimioterápicos (figura 1). Essa resistência pode estar associada a presença de células tronco tumorais que não persistiram ao tratamento com os fármacos.

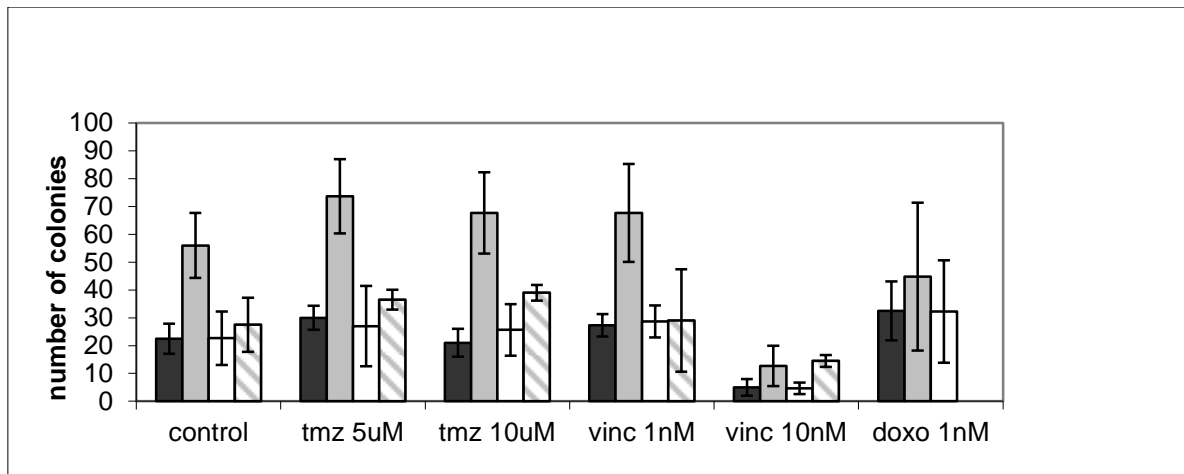


Figura 1. Ensaio Clonogênico após tratamento por 48 horas e manutenção por 10 dias. As linhagens silenciadas de U87-MG para XIAP (U87shX), survivina (U87shS) e, GFP (U87shGFP) como controle, foram testadas em baixas doses de 5 e 10 μ M de temozolamida (tmz), 1 e 10 nM de vincristina (vinc) e 1 nM de doxorrubicina (doxo) (n=3). Doses maiores não apresentaram colônias para análise.

O meio de cultivo de células usado para indução de esferas é normalmente enriquecido com fatores de crescimento e na ausência de soro fetal bovino (SFB). A formação de esferas de células é indicativa da presença de células com características indiferenciadas (Zhang, 2006). O uso de SFB nas concentrações de 5 ou 10% nesse estudo não influenciou significativamente a formação de esferas entre as linhagens silenciadas (figura 2). A formação de esferas foi inibida para todas as linhagens quando tratadas com Doxo 10 nM em SFB, mas mantendo células aderidas (figura 3). No entanto, a dose menor de Doxo (1 nM)

reduziu a quantidade de esferas apenas em WT e não afetando o crescimento de esferas em células silenciadas para XIAP ou Survivina. Estudos com TMZ e CSC ainda são contraditórios (Beier, 2008; Gilbert, 2010), e os resultados apresentados neste estudo com baixa dose (5 μ M) mostram redução significativa da quantidade de esferas nas linhagens utilizadas mas sem que o silenciamento de XIAP e survivina promovesse qualquer efeito diferencial em relação à WT .

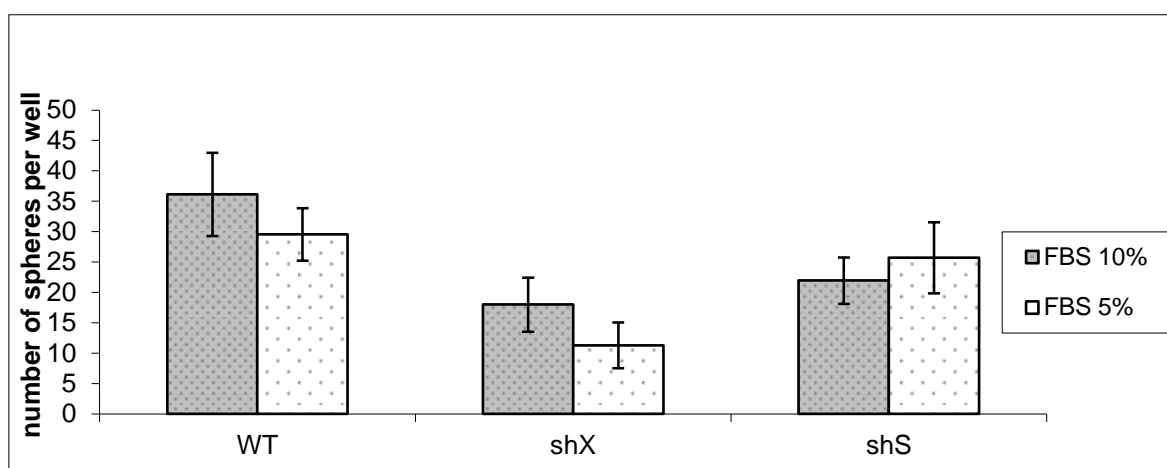


Figura 2. Efeito da concentração de soro fetal bovino no crescimento de tumor-esferas. As células U87WT, silenciadas para XIAP (shX) e silenciadas para survivina (shS), mantidas por 7 dias com meio enriquecido com soro fetal bovino (SFB) 5 e 10% foram contadas de acordo com o número de esferas presentes no 7^o dia. Não houve diferença significativa entre os meios utilizados (n=3).

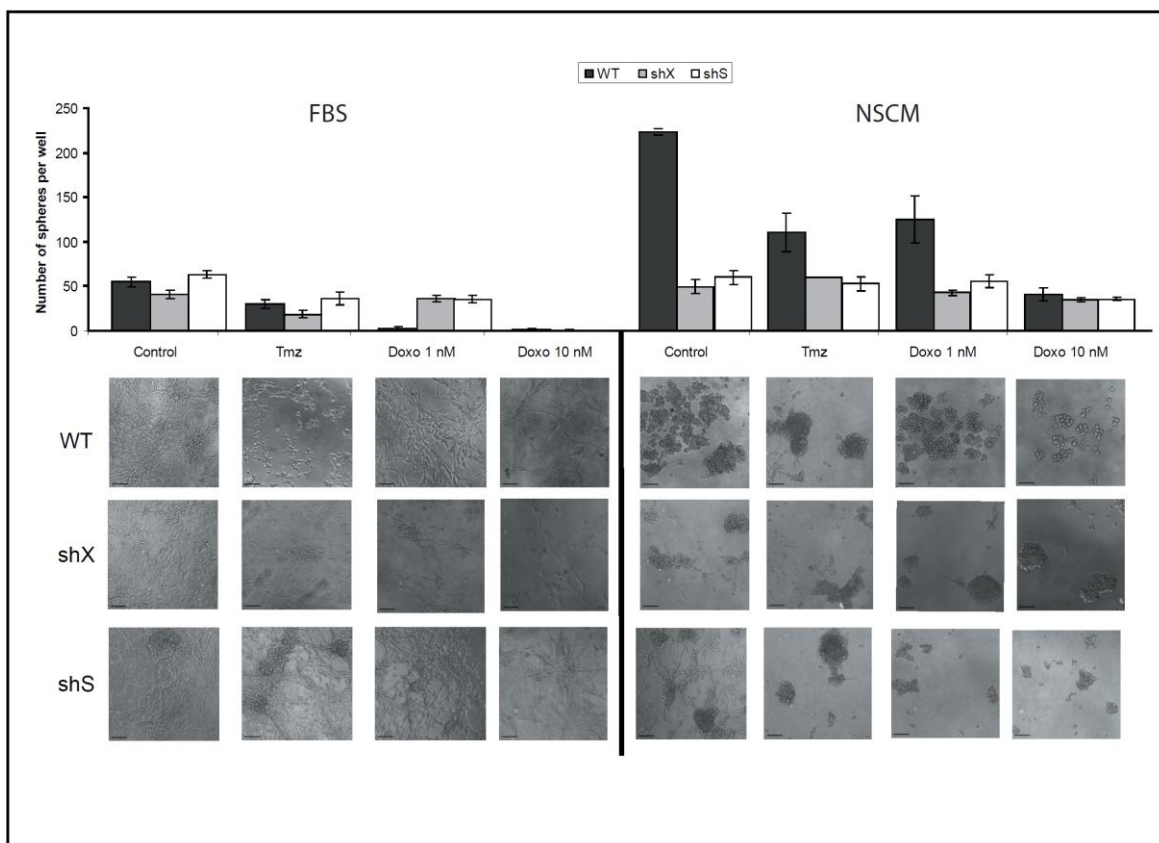


Figura 3. Ensaio Esferogênico de células silenciadas com sh-XIAP e sh-survivina. As células foram após tratamento de 7 dias com temozolamida 5 μ M e doxorubicina 1 e 10 nM. (A) As células U87 silenciadas para XIAP (shX) e survivina (shS) foram comparadas com U87WT com soro fetal bovino (FBS – fetal bovine serum) e meio enriquecido com fatores de crescimento (NSCM)(n=3). Escala de 50 μ m.

Já o uso de meio com fatores de crescimento para CSC (NSCM), como esperado apresentou significativo aumento de formação de esferas em relação ao meio contendo soro. O tratamento com TMZ e Doxo reduziu o número de esferas em relação ao não tratado para a linhagem selvagem (figura 3). As células silenciadas apresentavam menos esferas na ausência de tratamento e este nível não foi afetado pelo silenciamento da survivina ou da XIAP. Yu (2008) encontrou um resultado similar em que Vincristina promoveu aumento da população CSC,

possivelmente por um mecanismo de resistência a apoptose presente nas CSC. Isso poderia indicar que as células silenciadas não são sensíveis ao estímulo de crescimento de esferas ou ainda que não houvesse CSC nessas linhagens. No entanto, a presença de células positivas para os marcadores de células indiferenciadas OCT4, NANOG e CD133 (Prominina-1), foram detectadas nas linhagens silenciadas, ainda que numa proporção menor (dados ainda preliminares).

Esses dados até o momento demonstram que há possivelmente a mesma proporção de células positivas nas linhagens silenciadas e para shS para os marcadores OCT4, NANOG se comparadas a WT (figura 4)(dados parciais).

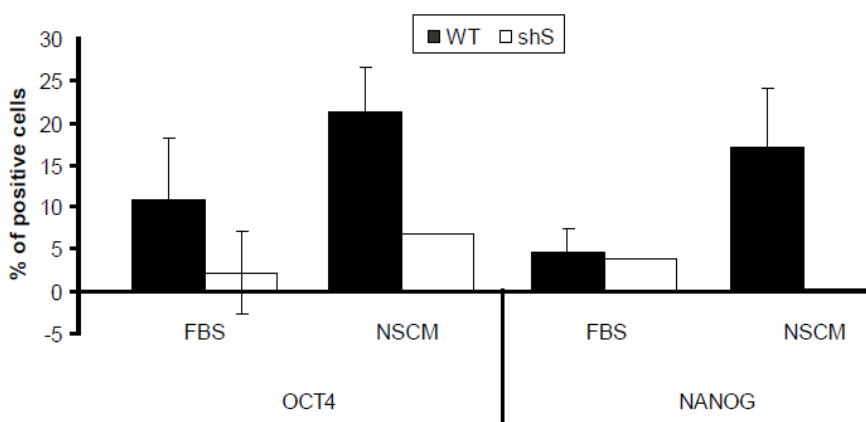
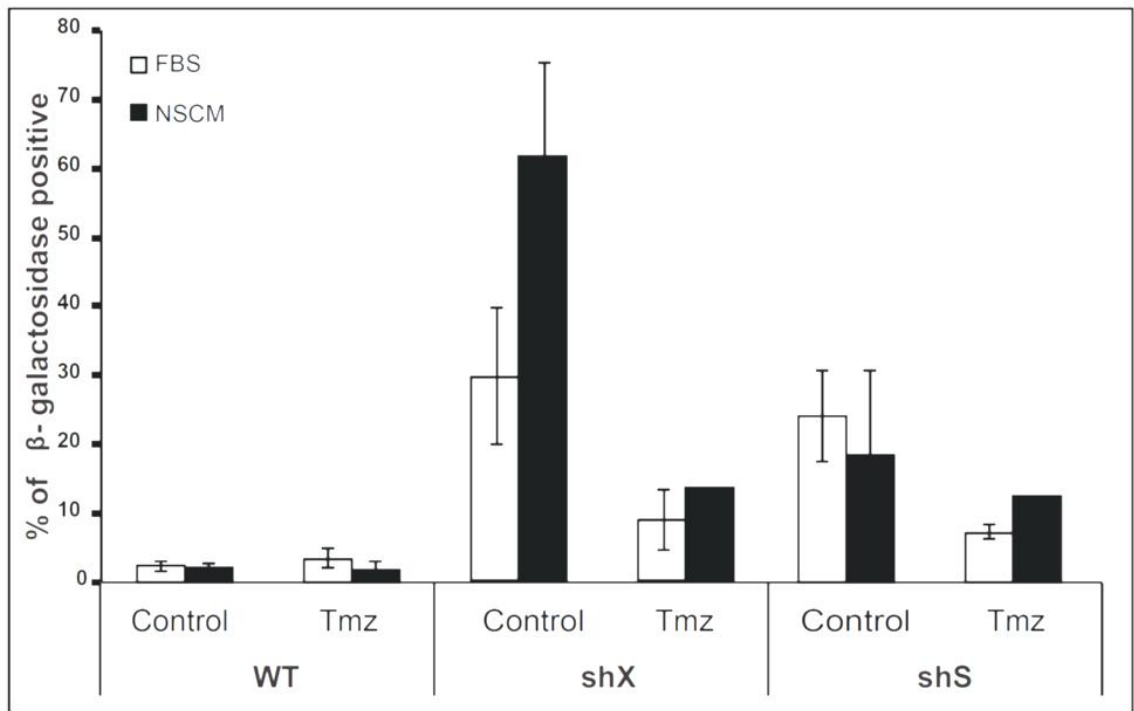
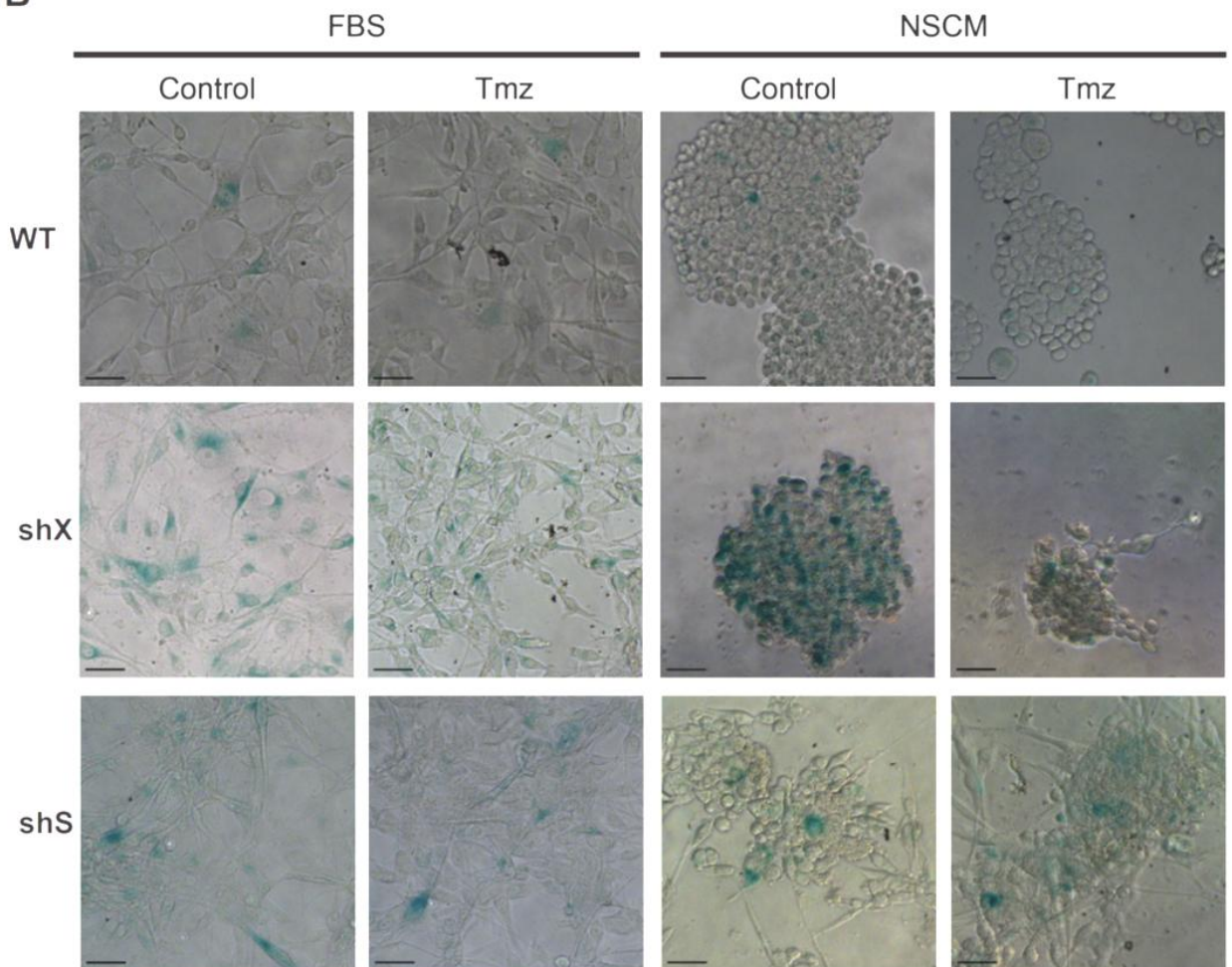


Figura 4. Citometria para marcadores de células indiferenciadas. Percentagem de células positivas para OCT4 e NANOG em U87WT e silenciada para survivina (shS) na presença de soro ou em meio enriquecido com fatores de crescimento (NSCM).(n=2)

Embora existam indicativos que a população de CSC sejam resistentes a Doxo (Liu, 2006; Kikuchi, 2008), os resultados aqui parecem ser dose-dependentes. As linhagens silenciadas parecem ser resistentes na baixa dose de

1 nM, mas a presença de CSC precisa ainda ser confirmada por marcadores moleculares, bem como os testes com a linhagem controle de interferência.

Nos tratamentos com DOXO, a proporção de células senescentes entre as células silenciadas é maior que WT, e na presença de meio NSCM, esse efeito parece aumentado entre as células shX (figura 5). Somado ao resultado do ensaio formador de esferas em que shX apresentou redução de esferas, esse aumento de senescência em shX pode indicar um possível destino para as células formadoras de esferas (e também as CSC), estimulado por NSCM.

A**B**

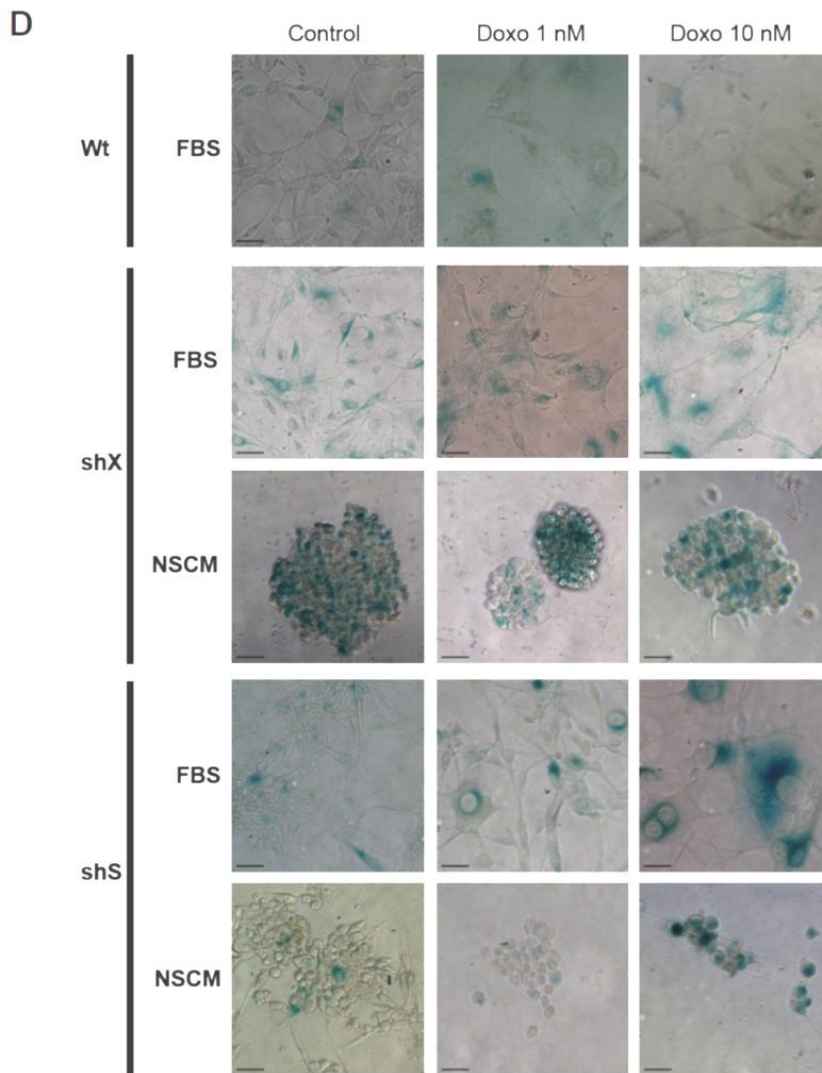
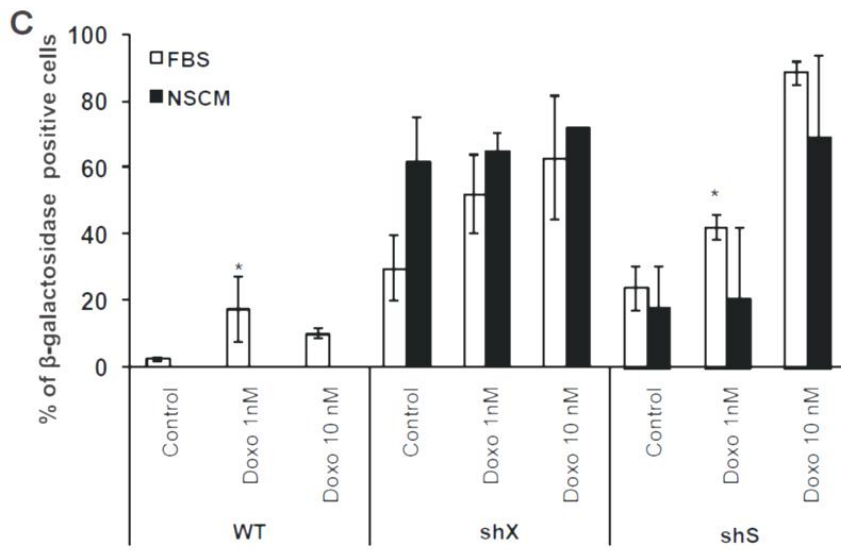


Figura 5. Senescência celular em células silenciadas tratadas com temozolamida e doxorribicina. (A) No eixo y, a porcentagem de células β -gal positivas em U87WT, silenciadas para XIAP (shX) e silenciadas para survivina (shS) após tratamento por 7 dias com TMZ 5 μ M em meio com soro fetal bovino (FBS) ou meio contendo fatores de crescimento (NSCM). (B) Imagens da marcação de SA- β -gal, em que células azuis foram consideradas positivas ou senescentes.8 Escala de 50 μ m. (C) No eixo y, a porcentagem de células β -gal positivas em U87WT, silenciadas para XIAP (shX) e silenciadas para survivina (shS) após tratamento por 7 dias com Doxo 1 e 10 nM em meio com soro fetal bovino (FBS) ou meio contendo fatores de crescimento (NSCM). (D) Imagens da marcação de SA- β -gal, em que células azuis foram consideradas positivas ou senescentes Escala de 50 μ m. Os resultados representam média de experimentos independentes \pm o erro padrão da média e avaliados com ANOVA seguido do teste SNK ; * $p < 0,05$.

TMZ não parece ter influenciado na indução de senescência como Doxo, um fármaco indutor clássico de apoptose e senescência (Rebbaa, 2003). Doxo aumentou significativamente os níveis de senescência em shS, mas sem diferença entre SFB e NSCM. Os resultados do ensaio SA- β -gal foram similares a análise morfométrica (figura 6) dos núcleos das células analisadas, reforçando os indicativos de senescência celular (figura 5C e 5D). A senescência pode ser ativada por resposta a um estresse como a presença de um quimioterápico (indutor de danos ao DNA como TMZ e Doxo), além de reprogramar células a pluripotência induzida por fatores Yamanaka (OCT4, Sox2, Klf4 e c-Myc)(Banito, 2010).

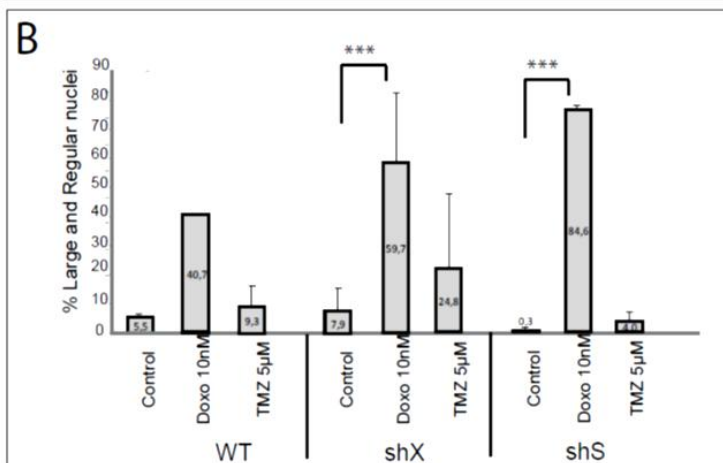
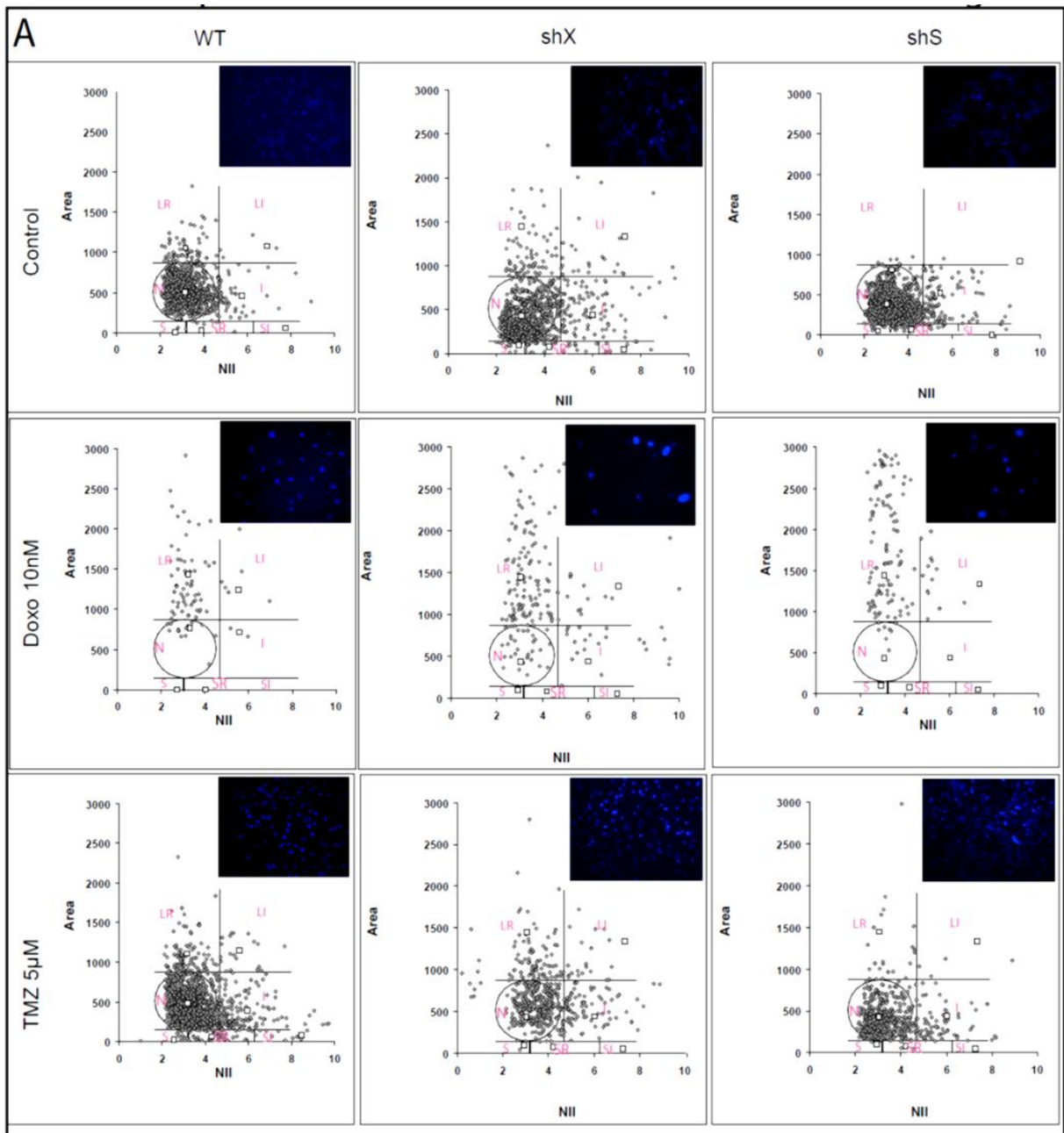


Figura 6. Análise Morfométrica dos Núcleos das Células silenciadas após tratamentos com doxorubicina e temozolamida. (A) A área (em pixels) e o índice de integridade nuclear (NII) de cada núcleo foi medido através das imagens dos núcleos marcados com DAPI. As regiões do gráfico indicam características nucleares: normal (N); pequeno e regular (SR - *small and regular*); grande e regular (LR - *large and regular*); irregular (I). (B) Quantificação dos núcleos grandes e regulares (LR) como indicativo de senescência celular. Os resultados representam média de experimentos independentes \pm o erro padrão da média e avaliada com ANOVA seguido do teste SNK; *** $p < 0,001$.

Embora esse seja ainda um estudo preliminar, e apenas avaliado os fármacos DOXO e TMZ, há importantes indícios de que após o silenciamento de XIAP e survivina, U87-MG além de conservar parte da população CSC, pode ainda representar que a senescência pode ser induzida por estímulos apoptóticos (Banito and Gil 2010) aqui gerados por TMZ e Doxo. Esse efeito é importante porque indica que a combinação do silenciamento de IAP's e Doxo podem atingir também as CSC, reduzindo a chance de recidiva desse tipo tumor tão agressivo.

Capítulo V

Discussão

A terapia para gliomas usada atualmente necessita de opções mais encorajadoras para aprimorar com novos alvos moleculares e novas metodologias. A família das IAPs é um alvo importante da terapia de vários tipos tumorais (Schimmer, 2004; Hunter, 2007; LaCasse, 2008), como carcinoma hepatocelular (Augello, 2009), câncer de próstata (Gill, 2009), câncer de mama (Lima, 2004), câncer de pulmão (Hu, 2003; Cao 2004) e em gliomas (Fulda, 2002; Naumann, 2007; Vellanki, 2009). Atingir especificamente IAPs é bastante desejado, mas ainda poucos fármacos parecem atuar diretamente nessas proteínas, como é o caso de embelin, um fármaco inibidor de XIAP capaz de induzir apoptose inclusive em gliomas (Nikolovska-Colesk, 2004; Ahn, 2007). Assim, metodologias que fazem uso de antagonistas e moléculas desenhadas para inibição de XIAP trouxeram resultados promissores em ensaios clínicos I e II; enquanto que para survivina existem estudos em fase I de vacinas com peptídeos de survivina (Kelly, 2011; Miyazaki, 2011) para gliomas entre outras propostas em fase inicial ainda (LaCasse, 2008)(<http://tinyurl.com/cy4um3z>, capturado em 29/02/2012) .

No trabalho desenvolvido nessa tese foram silenciadas parcialmente, e separadamente, duas proteínas da família das IAPs altamente expressas em gliomas e outros tumores: XIAP e survivina (Wagenknecht, 1999; Das, 2002; Blanc-Brude, 2003; Jiao, 2004; Grunda, 2006; Hunter, 2007). O silenciamento estável através do uso de vetores lentivirais nos permitiu a criação de linhagens modificadas que, permanentemente, expressaram uma seqüência shRNAi.

Embora nesse trabalho o uso de vetores lentivirais seja uma ferramenta de estudo em IAPs em uma linhagem de GBM *in vitro*, o uso desses vetores como estratégia terapêutica demonstra que a transdução de gliomas é possível *in vivo* (Miletic, 2004) e são capazes de atingir células CD133, Nestina e SOX2 positivas (Huszthy, 2009). Esses estudos demonstram que possivelmente os experimentos realizados nesse trabalho possam ser repetidos com sucesso *in vivo*.

A expectativa dos resultados com o silenciamento de proteínas inibidoras de apoptose era de que muitas das células transduzidas entrassem em apoptose espontaneamente ao longo do processo de expressão do shRNAi. É bastante provável que logo que as células foram transduzidas muitas delas tenham de fato morrido por estímulo apoptótico, tendo sobrevivido apenas aquelas que tinham os maiores níveis de expressão da proteína, ou que a expressão do shRNAi tenha sido menor, ou ainda que tivessem algum mecanismo complementar (como a compensação de atividade de outras IAPs). Certamente, para que essas linhagens sobrevivessem e se mantivessem proliferando, mecanismos de adaptação e resistência a apoptose foram restabelecidos. Foi identificado como possíveis mecanismos de resistência na linhagem shX a superexpressão de survivina e na linhagem shX a super-expressão da survivina (capítulo II). Isso é importante porque nosso trabalho difere dos estudos em que XIAP e survivina foram silenciados de forma transiente, dos quais a indução de apoptose foi mais evidente. Aqui, avaliamos como uma linhagem de glioma reage a diversos fármacos relacionados à terapia oncológica com aproximadamente 50% menos da proteína XIAP e 70% menos da proteína survivina.

Embora XIAP e survivina sejam inibidoras de apoptoses clássicas, XIAP está mais envolvida no bloqueio da via apoptótica através de interações diretas com caspases executoras e sinais mitocondriais inibitórios como SMAC/DIABLO. Survivina, por ter funções tanto no citoplasma (interagindo com proteínas da ativação mitocondrial de apoptose), quanto durante a mitose (participando da organização do fuso mitótico) poderia elucidar os primeiros passos do sinal apoptótico em resposta a danos ao DNA e a catástrofe mitótica ainda no núcleo. Assim, as duas proteínas apesar de pertencer à mesma família de proteínas, parecem atuar em momentos e eventos diferentes da morte celular. Embora existam variantes de processamento do mRNA da survivina que sugerem funções em diferentes locais dentro da célula (Caldas, 2005), as seqüências usadas para o silenciamento realizado nesse trabalho tem como alvo todas as variantes de survivina e XIAP. A relação inversa da expressão protéica da XIAP e survivina nas linhagens silenciadas nesse trabalho pode ser justificada pelas atuações diversas desempenhadas por survivina em particular, visto que survivina parece bastante influente na regulação da função de XIAP.

Survivina é uma proteína com frações presentes tanto no citoplasma, no interior das mitocôndrias quanto no núcleo. Quando liberada do interior das mitocôndrias (junto com outros sinais apoptóticos) ao citoplasma pode inibir a ativação de caspases 9 e formar complexo com XIAP capaz de inibir a degradação dessa proteína (Dohi, 2004). A formação desse complexo sofre regulação de PKA (Dohi, 2007) e XAF-1 (Liston, 2001); um inibindo a formação do complexo XIAP-survivina e outro seqüestrando XIAP do citoplasma. A antagonização ou inibição de survivina pode levar a importantes alterações na

citocinese que podem gerar aneuploidias nas células (Li, 1998; Chen, 2000; Caldas, 2006) além de que a inibição de survivina na função de p53 sugere uma importante regulação da tumorigênese, visto que a superexpressão de survivina em células apoptóticas pode ser induzida por p53 (Das, 2002; Mirza, 2002). Apesar disso, uso de moléculas inibidoras e o silenciamento de XIAP utilizados em outros trabalhos não demonstraram compensações de níveis de outras IAP's, nem survivina, como observado nos GBMs U87-MG nesse trabalho (McManus, 2004; Naumann, 2007). Apesar da compensação das proteínas XIAP e survivina apresentadas nas células silenciadas, isso não pareceu ter atingido a funcionalidade delas. XIAP e survivina não possuem funções complementares, e conforme a hipótese desse trabalho, as células silenciadas foram sensíveis a alguns fármacos de forma similar.

Do contrário ao que esperávamos, as linhagens silenciadas não apresentaram crescimento celular reduzido, nem alterações no ciclo celular e senescência. Isso indicou que o silenciamento parcial das proteínas XIAP e survivina não afetaram as principais vias de manutenção da célula, e que a indução de apoptose não ocorreu na ausência de estímulos.

Dos diversos fármacos usados nesse trabalho, alguns tinham alvos semelhantes, e por isso a expectativa era encontrar efeitos similares. No entanto, Doxo e Etopo, dois fármacos que atuam sobre topoisomerasas, tiveram efeitos distintos. Os quimioterápicos que atuam em topoisomerase II durante o mecanismo de reparo de DNA são chamados de tóxicos quando estabilizam o complexo de clivagem gerado pelo mecanismo de reparo; ou inibidores quando afetam topoisomerase II sem a estabilização do complexo de clivagem (Li, 2001;

Montecucco, 2007). Etopo e Doxo são agentes tóxicos da topoisomerase II, que podem ter ação influenciada pelos níveis da enzima apresentados pela célula, que reduzidos podem conferir resistência (Montecucco, 2007). A pequena sensibilidade de Etopo pode ser explicada por um estudo que mostrou que U87-MG é uma linhagem de glioma com baixa expressão de topoisomerase II (Sevim, 2011), mas que teve a sensibilidade aumentada com o silenciamento de XIAP e survivina. Doxo, por outro lado, apresentaram, além do efeito tóxico na topoisomerase II, diversos efeitos na molécula de DNA como agente intercalante, alquilante e indutor de *crosslinks* (Minotti, 2004). Essas diferenças entre os dois fármacos e o silenciamento estável de XIAP e survivina, podem indicar as razões para Doxo ter maior efeito entre as células silenciadas e a controle.

Os principais resultados nesse estudo foram Doxo 1 μM e Vinc 100 nM devido aos primeiros resultados do ensaio de viabilidade celular MTT. Quando administrado a pacientes, Doxo pode atingir um pico de 5 μM no plasma, e se mantém estável em concentrações de 25 a 250 nM (Minotti, 2004). Apesar de Doxo não ser um fármaco clássico do tratamento de gliomas, as boas perspectivas demonstradas por esse fármaco motivaram a busca de alternativas para que ela se tornasse biodisponível no GBM. Lipossomos (Chen, 2011; Qin, 2011), esferas (Baltes, 2010), polietilenoglicol revestido de lipossomos (Kikuchi, 2008), nanopartículas (Steiniger, 2004; Verreault, 2011; Wohlfart, 2011), cápsulas e injeções diretas (Lesniak, 2005) demonstram que há sim uma possibilidade alternativa para o uso de Doxo em paciente com GBM. Para isso é preciso avaliar bem as respostas de GBMs frente a diferentes doses de Doxo, porque o mesmo fármaco pode induzir tanto apoptose em doses acima de 10 μM quanto

senescência em doses abaixo de 1 μ M (Rebbaa, 2003). No presente estudo, vimos tanto apoptose quanto senescência nos gliomas silenciados para XIAP e Survivina na dose de 1 μ M. Através da expressão de H2Ax ativada e do acentuado aumento da expressão de p53 após os tratamentos com Doxo 1 μ M ficou nítido que tanto em WT quanto nas linhagens silenciadas, a resposta apoptótica ocorrem em resposta ao dano ao DNA. De forma interessante, as células que não cederam a morte apoptótica e necrótica, entraram em senescência após 48 horas de tratamento e perderam a capacidade proliferativa ao final de 10 dias sem a presença do fármaco. Essa avaliação de longo prazo dos efeitos do tratamento de 48 horas não mostrou diferença significativa entre células controle e silenciadas, mostrando que apenas o silenciamento de XIAP e survivina não mantém os efeitos de um breve tratamento.

Vincristina e taxol apresentaram um efeito semelhante apenas nas células controle; enquanto a primeira apresentou fortes sinais de indução de catástrofe mitótica (como visto nos resultados analisados com DAPI e Anexina), taxol não parece ter afetado as linhagens silenciadas. Entre os mecanismos de resistência ao taxol está o aumento da expressão de MDR1 e conseqüentemente da glicoproteína P, capazes de expulsar o fármaco do interior da célula (Casazza, 1996). Outro mecanismo de resistência pode ser apresentado por células que tenham mutações na tubulina (Paraskevi, 2000). Um estudo com a linhagem celular MCF7, de câncer de mama, apresentou aumento da expressão de survivina após o tratamento com taxol (Ling, 2004). Se taxol induzir o aumento da expressão de survivina em gliomas, o fármaco pode ter anulado o efeito do silenciamento de survivina.

O fato de que alguns fármacos não afetarem a viabilidade celular em 48 horas de forma diferencial entre silenciadas e controle não diminui a importância desses fármacos para tratamentos crônicos. O ensaio clonogênico das linhagens silenciadas com TMZ nos deixou claro que mesmo após 48 horas e 10 dias livre de tratamento, houve efeito anti-proliferativo. O ensaio de viabilidade serviu para escolher os fármacos que estariam promovendo apoptose preferencialmente, e a escolha de tempo foi baseada na velocidade da resposta apoptótica. Depois de ativada a clivagem de caspase, a execução de apoptose pode ocorrer em minutos (Green, 2005), e para as linhagens silenciadas havia hipoteticamente maior facilidade de realizar os disparos de sinalização apoptótica o que pode ser confirmado no ensaio de caspase 3.

Avaliando os efeitos dos tratamentos, apoptose e senescência foram os principais processos celulares encontrados nas células silenciadas. Se apoptose pode ocorrer em pouco tempo, senescência é um processo associado ao desgaste celular ao longo do tempo de vida ou passagens da célula. Em nosso estudo, a senescência foi induzida nos tratamentos de apenas 48h, como um possível escape da via apoptótica. Embora não esperássemos encontrar senescência, e sim apoptose, essa possibilidade é ainda um efeito interessante e desejável na clínica de tumores agressivos como gliomas (Lleonart, 2009; Ewald, 2010). Tratamos também ao longo de sete dias os GBMs silenciados para avaliação das CTTs, onde encontramos taxas maiores de senescência entre as linhagens silenciadas ainda que na presença de células positivas para marcadores de indiferenciação. Esse efeito pode ser considerado benéfico porque CTTs estão relacionadas ao pior prognóstico dos pacientes, e esses resultados (se

confirmado com novos experimentos) podem significar que o silenciamento de XIAP e survivina sensibilizou também essa população de células.

A avaliação do efeito de diferentes doses de Doxo na população de CTTs se fez necessária para evitar que mecanismos de resistência presentes nas CTTs, como visto em melanomas através de transportadores ABCB5 e ABCB8 (Frank, 2005; Elliott, 2009) e mecanismos de reparo acentuados em gliomas (Bao, 2006; Clevers, 2011) possam reduzir as chances de sucesso em tratamentos clínicos. Nesse estudo, baixas doses de Doxo (1 e 10 nM) foram administradas com indução de senescência similar ao encontrado no tratamento agudo. A indução de senescência apenas com a presença do meio de cultura NSCM por 7 dias ainda não pode ser explicada, necessitando ainda de experimentos que indiquem que fatores influenciariam nesse efeito. É preciso salientar que SA- β -GAL foi o único experimento realizado para detecção de senescência celular. A análise de morfologia nuclear nesse caso ficou impossibilitada devido a disposição dos núcleos quando as células se dispõem em esferas. Assim, se faz necessário o uso de outros marcadores que afastem a suspeita de que o meio enriquecido com fatores de crescimento de células tronco esteja levando a um resultado de falso positivo.

Sabendo que U87-MG é uma linhagem de glioma que preserva populações heterogêneas, incluindo células positivas para marcadores de indiferenciação como Oct4, Nanog e CD133 (Singh, 2004), foi surpreendente que após o estressante processo de silenciamento usando vetor lentiviral pudesse ter mantido uma população de CTTs. O aspecto das células silenciadas nos indica que não houve seleção preferencial de uma ou outra população ao longo do

processo de transdução, especialmente por não perderem a capacidade de formação de tumor-esferas – embora sejam necessários marcadores específicos para confirmar isso.

Vincristina, por inibir a atuação dos microtúbulos ao longo da mitose, se destacou em nosso estudo com a perspectiva de avaliar a indução de apoptose em gliomas silenciados com shRNAi de Survivina. Nos experimentos de marcação com anexina, o fármaco na dose de 100 nM teve uma resposta difusa para ambas células silenciadas. A morte apoptótica não ficou clara, necrose esteve presente em níveis consideráveis e p53 não foi ativada, indicando uma possível catástrofe mitótica como efeito predominante em 48 h de tratamento. É possível que os resultados se tornem mais evidentes quando avaliados em diferentes tempos. De qualquer forma, no ensaio clonogênico ficou claro que o uso de Vinc em gliomas pode ser bastante promissor como já vem sendo descrito em outros trabalhos (Aydin, 2010; Brada, 2010).

A avaliação de morte celular foi realizada após 48 horas de tratamento na maioria dos experimentos. No entanto, o ensaio de caspases 3 mostrou que em 24 horas o efeito do silenciamento foi maior nos tratamentos com Doxo e Vinc que em 48 horas, mas que isso foi superado pela célula ao final de 24 horas seguintes. Isso mostra como as vias que regulam a viabilidade celular são tênues e rapidamente reestruturadas a ponto de exigir cautela ao comparar resultados obtidos em tempos diferentes.

Os experimentos aqui demonstrados compreenderam apenas a linhagem de GBM U87-MG, portadora de p53 ativa. O silenciamento de XIAP em U251, outra linhagem humana de GBM demonstrou até o momento que não apresentará

o mesmo efeito encontrado em U87-MG. A ausência da função de p53 impede que o glioma U251 apresente senescência (Brazdova, 2009), um dos efeitos do tratamento com Doxo. Além disso, U251 parece mais resistente a Vinc que U87-MG, indicando de que resultados obtidos nessa tese poderão ser estendidos, com reservas, a GBMs p53 positivos.

Conclusões

Principais resultados encontrados:

- O silenciamento estável de proteínas pró-apoptóticas como XIAP e survivina não reduz significativamente a proliferação da linhagem de gliomas U87-MG.
- Mecanismos compensatórios entre XIAP e survivina ocorrem após o silenciamento de cada uma dessas proteínas, mas o efeito do silenciamento não é anulado por essa regulação.
- Os gliomas U87-MG silenciados para XIAP e survivina se tornaram mais sensíveis após tratamento de 48 horas com doxorrubicina (1 μ M), vincristina (100 nM), etoposídeo (300 nM) e resveratrol (30 μ M).
- O fármaco doxorrubicina induziu apoptose e senescência com maior intensidade em gliomas U-87 silenciados para XIAP e survivina.
- O efeito dos tratamentos de 48 horas tanto com doxorrubicina quanto temozolamida e vincristina são iguais após 10 dias sem o fármaco, resultando na ausência de colônias.
- Doses baixas de doxorrubicina (1 nM), temozolamida (5 μ M) e vincristina (1 nM) após 48 horas de tratamento e 10 dias de manutenção não demonstrou diferença no número de colônias entre a linhagem controle e silenciadas.
- O fármaco vincristina gerou um tipo de morte difusa, com altas taxas de necrose, degradação nuclear, senescência e poucos eventos de apoptose.

- A dose de doxorubicina é determinante no efeito sobre as células positivas para marcadores de células tronco, sendo eliminadas na dose 10 μM e selecionadas com 1 μM . Esta última dose pode ainda levar as células diferenciadas a senescência.
- O fármaco temozolamida neste trabalho foi capaz de reduzir a população de células positivas para marcadores de células tronco.
- O uso de vetor lentiviral para a expressão de RNAs de interferência de expressão estável não eliminou a população tronco tumoral, nem a capacidade de formar esferas da linhagem de glioma U87-MG.
- O silenciamento de XIAP na linhagem de glioma humano U251 não apresentou similar sensibilidade aos quimioterápicos doxorubicina, vincristina e etoposídeo como observado em u87-MG.

Perspectivas geradas pelo trabalho

Sensibilização de gliomas ao silenciamento de XIAP e Survivina:

- Avaliar o efeito do silenciamento das proteínas XIAP e survivina em outros membros da família as IAPs, como c-IAP1 e c-IAP2.
- Ampliar os experimentos de ensaios clonogênicos para outros fármacos, bem como avaliar o efeito crônico dos fármacos utilizados em doses baixas.
- Identificar alterações na localização de survivina (núcleo, citoplasma ou mitocôndria) nas linhagens silenciadas.
- Repetir a metodologia em glioma primário com p53 funcional.
- Avaliar o crescimento das linhagens silenciadas em modelo animal nude *in vivo*.
- Concluir as análises de viabilidade celular na linhagem de glioma humano U251.

Efeito de Temozolamida e Doxorrubicina na população tronco tumoral de gliomas

- Avaliar se os mecanismos de reparo divergem entre as doses de doxorrubicina utilizadas através de ensaio cometa e western blot para a proteína H2Ax fosforilada.
- Realizar análises de ciclo celular e anexina através de citometria de fluxo para analisar possíveis alterações de crescimento e apoptose.

- Avaliar a expressão dos transportadores ABCB5 e da expressão dos genes MDR como um possível mecanismo de resistência a doxorrubicina ativado em células tronco tumorais.
- Buscar a separação das células positivas para oct4, cd133 e nanog através de citometria “Fluorescence-Activating Cell Sorting” para avaliação do efeito de doxorrubicina e temozolamida nessas linhagens em modelo animal nude in vivo.

Efeito crônico Doxorrubicina e Vincristina nos gliomas silenciados para XIAP e Survivina

- Aumentar o tempo de tratamento dos fármacos em doses mínimas (já estipuladas pelos experimentos de MTT) e avaliar através de ensaio clonogênico o impacto desses tratamentos no crescimento celular.

▪ Referências Bibliográficas

- AHN, K. S.; SETHI, G; AGGARWAL, B. B. Embelin, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein, blocks nuclear factor-kappaB (NF -kappaB) signaling pathway leading to suppression of NF -kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products." *Molecular Pharmacology*, 71(1) : 209-219, 2007.
- ALMUBARAK M.; NEWTON, M.; ALTAHA, R. Reinduction of Bevacizumab in Combination with Pegylated Liposomal Doxorubicin in a Patient with Recurrent Glioblastoma Multiforme Who Progressed on Bevacizumab/Irinotecan. *Journal of Oncology*, 2008:1-4, 2008.
- ALTIERI, D. C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy." *Trends Molecular Medicine*, 7(12): 542 -547, 2001.
- ALTIERI, D. C. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Progress in Cell Cycle Research*, 5(45): 447 -452, 2003.
- ALTIERI, D. C. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3): 478 -482, 2006.
- ALTIERI, D. C. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochemical Journal*, 430(2): 199 -205, 2010.
- AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8): 917 -921, 1997.
- AUGELLO C.; CARUSO, L.; MAGGIONI, M.; DONADON, M.; MONTORSI M.; SANTAMBROGIO, R.; TORZILLI, G.; VAIRA, V.; PELLEGRINI C.; RONCALLI, M.; COGGI, G.; BOSARI, S. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BioMed Central Cancer*, 9(125): 1 -10, 2009.
- AYDIN B.; PATIL, M.; BEKELE, N.; WOLFF, J. E. Vincristine in high-grade glioma. *Anticancer Research*, 30(6): 2303 -2310, 2010.

- BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? *Molecular Cell Biology*, **6(6)** : 505-510, 2005.
- BALTES, S.; FREUND, I.; LEWIS, A. L.; NOLTE, I.; BRINKER, T. Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: a pilot study in a rat model. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, **21(4)**: 1393 - 1402, 2010.
- BANITO, A. & GIL, J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Reports*, **11(5)**: 353 -359, 2010.
- BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444(7120)**: 756 -760, 2006.
- BARRETT, L. E.; GRANOT, Z.; COKER, C.; IAVARONE, A.; HAMBARDZUMYAN, D.; HOLLAND, E. C.; NAM, H. S. ; BENEZRA, R. Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma. *Cancer Cell*, **21(1)**: 11 -24, 2012.
- BARTKE, T.; POHL, C.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, **14(6)** : 800-811, 2004.
- BARTKOVA, J.; REZAEI, N.; LIONTOS, M.; KARAKAIDOS, P.; KLETSAS, D.; ISSAEVA, N.; VASSILIOU, L. V.; KOLETTAS, E.; NIFOROU, K.; ZOUMPOURLIS, V. C.; TAKAOKA, M.; NAKAGAWA, H.; TORT, F.; FUGGER, K.; JOHANSSON, F.; SEHESTED, M.; ANDERSEN, C. L.; DYRSKJOT, L.; ØRNTOFT, T.; LUKAS, J.; KITTAS, C.; HELLEDAY, T.; HALAZONETIS, T. D.; BARTEK, J.; GORGOULIS, V. G. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, **444(7119)**: 633 -637, 2006.
- BEIER, D.; HAU, P.; PROESCHOLDT, M.; LOHMEIER, A; WISCHHUSEN, J.; OEFNER, P. J.; AIGNER, A.; BRAWANSKI, A.; BOGDAHN, U.; BEIER, C. P. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma -derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Reserarch*, **67(9)**: 4010 -4015, 2007.

- BEIER, D.; RÖHRL, S.; PILLAI, D. R.; SCHWARZ, S.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; LEUKEL, P.; PROESCHOLDT, M.; BRAWANSKI, A.; BOGDAHN, U.; TRAMPE-KIESLICH, A.; GIEBEL, B.; WISCHHUSEN, J.; REIFENBERGER, G.; HAU, P.; BEIER, C. P. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Research*, **68**(14): 5706-5715, 2008.
- BEIER, D., SCHULZ, J.B.; BEIER, C. P. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Molecular Cancer*, **11** (10) : 128, 2011.
- BLANC-BRUDE, O. P.; MESRI, M.; WALL, N. R.; PLESCIA, J.; DOHI, T.; ALTIERI, D. C. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, **9**(7): 2683 -2692, 2003.
- BLEAU, A. M.; HAMBARDZUMYAN, D.; OZAWA, T.; FOMCHENKO, E. I.; HUSE, J. T.; BRENNAN, C. W.; HOLLAND, E. C. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, **4**(3): 226 -235, 2009.
- BODNAR, A. G.; OUELLETTE, M.; FROLKIS, M.; HOLT, S. E., CHIU C., MORIN, G. B.; HARLEY, C. B.; SHAY, J. W.; LICHTSTEINER, S., WRIGHT, W. E. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, **279**(5349), 1998 .
- BOKAREWA, M.; TARKOWSKI, A.; MAGNUSSON, M. Pathological survivin expression links viral infections with pathogenesis of erosive rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**(2 -3): 192 -198, 2007.
- BRADA, M.; STENNING, S., GABE, R., THOMPSON, L. C.; LEVY, D.; RAMPLING, R.; ERRIDGE, S.; SARAN, F.; GATTAMANENI, R.; HOPKINS, K.; BEALL, S.; COLLINS, V. P.; LEE, S.M. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *Journal Clinical Oncology*, **28**(30): 4601 -4608, 2010.
- BRAIG, M. & SCHMITT, C.A. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Research*, **66**(6): 2881-2884, 2006.

- BRANDNER, S. Nanog, Gli, and p53: a new network of stemness in development and cancer. *The EMBO Journal*, 29 (15) : 2475-2476, 2010.
- BRÁZDOVÁ, M.; QUANTE, T.; TÖGEL, L.; WALTER, K.; LOSCHER, C.; TICHÝ, V.; ČINČÁROVÁ, L.; DEPPERT, W.; TOLSTONOG, G. V. Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Research*, 37(5): 1486 -1500, 2009.
- BREDEL, M. & ZENTNER J. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. *The Lancet Oncology*, 3: 397-406, 2002.
- CALDAS, H.; HOLLOWAY, M. P.; HALL, B. M.; QUALMAN, S. J.; ALTURA, R. A. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *Journal of Medical Genetics*, 43(2): 119 -128, 2006.
- CALDAS, H.; JIANG, Y.; HOLLOWAY, M. P.; FANGUSARO, J.; MAHOTKA, C.; CONWAY, E. M.; ALTURA, R. A. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*, 24(12): 1994 -2007, 2005.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 729-740, 2007.
- CAMPISI, J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*, 120: 513-522, 2005.
- CAO, C.; MU, Y.; HALLAHAN, D. E.; LU, B. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene*, 23: 7047-7052, 2004.
- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51: 5226-5231, 2003.
- CARTER, B. Z.; KORNBLAU, S. M.; TSAO, T.; WANG, R. Y.; SCHOBER, W. D.; MILELLA, M.; SUNG, H. G.; REED, J. C., ANDREEFF, M. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase

- inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *BLOOD*, 102(12): 4179 -4186, 2003.
- CARTER, B. Z.; MAK, D. H.; MORRIS, S. J.; BORTHAKUR, G.; ESTEY, E.; BYRD, A. L.; KONOPLEVA, M.; KANTARJIAN, H.; ANDREEFF, M. XIAP antisense oligonucleotide (AEG35156) achieves target knockdown and induces apoptosis preferentially in CD34+38- cells in a phase 1/2 study of patients with relapsed/refractory AML. *Apoptosis*, 16(1): 67 -74, 2011.
- CARTER, B. Z.; MAK, D. H.; SCHOBER, W. D.; KOLLER, E.; PINILLA, C.; VASSILEV, L. T.; REED, J. C.; ANDREEFF, M. Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML. *Blood*, 115(2): 306 -314, 2010.
- CARTER, B. Z.; MILELLA, M.; TSAO, T.; MCQUEEN, T.; SCHOBER, W. D.; HU, W.; DEAN, N. M.; STEELMAN, L.; MCCUBREY, J.A.; ANDREEFF, M. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 17(11): 2081 -2089, 2003.
- CASAZZA, A. M. & FAIRCHILD, C.R. PACLITAXEL (TAXOL): MECHANISMS OF Resistance. *Cancer Treat Res* **87**: 149-171, 1996.
- CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23: 2825-2837, 2004.
- CENTRAL BRAIN TUMOR REGISTRY OF THE UNITED STATES (CBTRUS) .
CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004 - 2007. 2011
- CERAMI, E.; DEMIR, E.; SCHULTZ, N.; TAYLOR, B. S.; SANDER C. Automated Network Analysis Identifies Core Pathways in Glioblastoma. *PLoS One* 5(2): e8918, 2010 .
- CHANDECK, C. & MOOI, W. J. Oncogene-induced Cellular Senescence. *Advances in Anatomic Pathology*, 17(1): 42-48, 2010.
- CHEN, H.; QIN, Y.; ZHANG, Q.; JIANG, W.; TANG, L.; LIU, J.; HE, Q. Lactoferrin modified doxorubicin-loaded procationic liposomes for the treatment of gliomas. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1 -2) : 164-173, 2011.

- CHEN, J.; WU, W.; TAHIR, S. K.; KROEGER, P. E.; ROSENBERG, S. H.; COWSERT, L. M.; BENNETT, F.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; WELSH, K.; REED, J. C.; NG, S. C. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*, 2(3): 235 -241, 2000.
- CLARKE, M. F. & M. FULLER. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 124(6): 1111 -1115, 2006.
- CLEVERS, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3): 313 -319, 2011.
- COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; PAZDUR, R. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*, 11(19 Pt 1): 6767 -6771, 2005.
- COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130: 223-233, 2007.
- COPPÉ, J. P.; DESPREZ, P. Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology*, 5: 99-118, 2010.
- COTTER, T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9: 501-507, 2009.
- CRESCENZI, E.; PALUMBO, G.; BRADY, H. J. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *The Biochemical Journal*, 375: 263-274, 2003.
- CROOK, N. E.; CLEM, R. J.; MILLER, L.K. An Apoptosis-Inhibiting Baculovirus Gene with a Zinc Finger-Like Motif. *Journal of Virology*, 67(4): 2168 - 2174, 1993.
- CUTTS, S. M.; NUDELMAN, A.; REPHAELI, A.; PHILLIPS, D. R. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life*, 57(2): 73 -81, 2005.
- DAN, H. C.; SUN, M.; KANEKO, S.; FELDMAN, R. I.; NICOSIA, S. V.; WANG, H. G.; TSANG, B. K.; CHENG, J. Q. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7): 5405 -5412, 2004.

- DARDING, M.; FETALM, R.; TENEV, T.; DARDING, M.; FELTHAM, R.; TENEV, T.; BIANCHI, K.; BENETATOS, C.; SILKE, J.; MEIER P. Molecular determinants of Smac mimetic induced degradation of cIAP1 and cIAP2. *Cell Death and Differentiation*, 18 (8): 1-11, 2011.
- DAS, A.; TAN, W. L.; SMITH, D. R. Expression of survivin in primary glioblastomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 128(6): 302 -306, 2002.
- DENYSENKO, T.; GENNERO, L.; ROOS, M. A.; MELCARNE, A.; JUENEMANN, C.; FACCANI, G.; MORRA, I.; CAVALLO, G.; REGUZZI, S.; PESCARMONA, G.; PONZETTO, A. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochemistry and Function*, 28(5): 343 -351, 2010.
- DEVERAUX, Q. L.; LEO, E.; STENNICKE, H. R.; WELSH, K.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO Journal*, 18(19): 5242 -5251, 1999.
- DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(6639): 300 -304, 1997.
- DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academ of Science of the Uinetd Stated of America*, 92: 9363-9367, 1995.
- DOHI T.; BELTRAMI, E.; WALL, N. R.; PLESCIA, J.; ALTIERI, D. C. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(8): 1117 -1127, 2004.
- DOHI, T.; OKADA, K.; XIA, F.; WILFORD, C. E.; SAMUEL, T.; WELSH, K.; MARUSAWA, H.; ZOU, H.; ARMSTRONG, R.; MATSUZAWA, S.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C.; ALTIERI, D. C. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33): 34087 - 34090, 2004.

- DOHI, T., XIA, F., ALTIERI, D. C. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Molecular Cell*, 27(1): 17 -28, 2007.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c -Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*, 102: 33-42, 2000.
- DU, Z.; JIA, D.; LIU, S.; WANG, F.; LI, G.; ZHANG, Y.; CAO, X.; LING, E. A.; HAO, A. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia*, 57(7): 724 -733, 2009.
- DUBREZ-DALOZ, L.; DUPOX, A.; CARTIER, J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*, 7(8): 1036 -1046, 2008.
- DULL, T.; ZUFFEREY, R.; KELLY, M.; MANDEL, R. J.; NGUYEN, M.; TRONO, D.; NALDINI, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, 72(11): 8463 -8471, 1998.
- DUMONT, P.; BURTON, M.; CHEN, Q. M.; GONOS, E. S.; FRIPPIAT, C.; MAZARATI, J. B.; ELIAERS, F.; REMACLE, J.; TOUSSAINT, O. Induction of Replicative Senescence Biomarkers by Sublethal Oxidative Stresses in Normal Human Fibroblast. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3): 361-373, 2000.
- ECKELMAN, B. P.; SALVESEN, G. S.; SCOTT, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*, 7(10): 988 -994, 2006.
- ELLIOTT, A.M. & AL-HAJJ, M.A. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Molecular Cancer Research*, 7(1): 79 -87, 2009.
- ELMORE S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495 -516, 2007.
- EOM, Y. W.; KIM, M. A.; PARK, S. S.; GOO, M. J.; KWON, H. J.; SOHN, S.; KIM, W. H.; YOON, G.; CHOI, K. S. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, 24: 4765-4777, 2005.

- ERAMO, A.; RICCI-VITIANI, L.; ZEUNER, A.; PALLINI, R.; LOTTI, F.; SETTE, G.; PILOZZI, E.; LAROCCA, L. M.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differentiation*, 13(7): 1238 -1241, 2006.
- EWALD, J.A.; DESOTELLE, J. A.; WILDING, G.; JARRARD, D. F. Therapy-Induced Senescence in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(20) : 1536-1546, 2010.
- FAN, Q. W. & WEISS, W. A. Targeting the RTK-PI3K-mTOR Axis in Malignant Glioma: Overcoming Resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 347: 279-296, 2010.
- FAN, X.; SALFORD, L. G.; WIDEGREN B. Glioma stem cells: evidence and limitation. *Seminars in Cancer Biology*, 17(3): 214 -218, 2007.
- FERREIRA, C. G.; VAN DER VALK, P.; SPAN, S. W.; LUDWIG, I.; SMIT, E. F.; KRUYT, F. A.; PINEDO, H. M.; VAN TINTEREN, H.; GIACCONE, G. Expression of X-linked Inhibitor of Apoptosis as a Novel Prognostic Marker in Radically Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients¹. *Clinical Cancer Research*, 7: 2468-2474, 2001.
- FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5(11): 876 -885, 2005.
- FESTJENS, N.; BERGHER, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757: 1371 - 1382, 2006.
- FILIPPI-CHIELA, E.C.; VILLODRE, E. S.; ZAMIM, L. L.; LENZ, G. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. *PLoS One*, 6(6), 2011 .
- FORTUGNO, P.; BELTRAMI, E.; PLESCIA, J.; FONTANA, J.; PRADHAN, D.; MARCHISIO, P. C.; SESSA, W. C.; ALTIERI, D. C. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 100(24): 13791 -13796, 2003.
- FRANK, N. Y.; MARGARYAN, A.; HUANG, Y.; SCHATTON, T.; WAAGA-GASSER, A. M.; GASSER, M.; SAYEGH, M. H.; SADEE, W.; FRANK, M.

- H. ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma. *Cancer Research*, 65(10): 4320 -4333, 2005.
- FRIDMAN, J.S. & LOWE, S.W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56): 9030-9040, 2003.
- FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124(3): 511 -515, 2009.
- FULDA, S.; WICK, W.; WELLER, M.; DEBATIN, K. M. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nature Medicine*, 8(8): 808 -815, 2002.
- GAGNON, V.; VAN THEMSCHE, C.; TURNER, S.; LEBLANC, V.; ASSELIN, E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis*, 13(2): 259 -271, 2008.
- GALBAN, S. & DUCKETT, C. S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death and Differentiation*, 17(1): 54-60, 2010.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19: 107-120, 2011.
- GALLUZZI, L. & KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7): 1161 -1163, 2008.
- GARRISON, J. B.; CORREA, R. G.; GERLIC, M.; YIP, K. W.; KRIEG, A.; TAMBLE, C. M.; SHI, R.; WELSH, K.; DUGGINENI, S.; HUANG, Z.; REN, K.; DU, C.; REED, J. C. ARTS and Siah collaborate in a pathway for XIAP degradation. *Molecular Cell*, 41(1): 107 -116, 2011.

- LIU, G.; YUAN, X.; ZENG, Z.; TUNICI, P.; NG, H.; ABDULKADIR, I. R.; LU, L.; IRVIN, D.; BLACK, K. L.; YU, J. S. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5(67), 2006 .
- GILBERT, C.A., DAOU, M.C., MOSER, R. P., ROSS, A. H. Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence. *Cancer Reserch*, 70(17): 6870 -6879, 2010.
- GILBERTSON, R.J. High-grade glioma: Can we teach an old dogma new tricks? *Cancer cell*, 9: 147-148, 2006.
- GILL, C.; DOWLING, C.; O'NEILL, A. J.; WATSON, R. W. Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Molecular Cancer*, 8(39) , 2009.
- GOLSTEIN P. & KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32(1): 37 -43, 2006.
- GORGOULIS, V.G. & HALAZONETIS, T.D. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6): 816 -827, 2010.
- GREEN, D.R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*, 121(5) : 671-674, 2005.
- GROSSMAN, D.; KIM, P. J.; BLANC-BRUDE, O. P.; BRASH, D. E.; TOGNIN, S.; MARCHISIO, P. C.; ALTIERI, D. C. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(7): 991 -999, 2001.
- GROSSMAN, D.; KIM, P.J.; SCHECHNER, J. S.; ALTIERI, D.C. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 98(2): 635 - 640, 2001.
- GRUNDA, J. M.; NABORS, L. B.; PALMER, C. A.; CHHIENG, D. C.; STEG, A.; MIKKELSEN, T.; DIASIO, R. B.; ZHANG, K.; ALLISON, D.; GRIZZLE, W. E.; WANG, W.; GILLESPIE, G. Y.; JOHNSON, M. R. Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10)

- and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *Journal of Neuro-oncology*, 80(3): 261 -274, 2006.
- GUICCIARDI, M. E.; MOTT, J. L.; BRONK, S. F.; KURITA, S.; FINGAS, C. D.; GORES, G. J. Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 (cIAP -1) Degradation by Caspase 8 During TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) - induced Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 317(1): 107 -116, 2011.
- GÜNTHER, W.; PAWLAK, E.; DAMASCENO, R.; ARNOLD, H.; TERZIS, A. J. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *British Journal of Cancer*, 88(3): 463 -469, 2003.
- GYRD-HANSEN M. & MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(8): 561 - 574, 2010.
- HADJIPANAYIS, C.G. & VAN MEIR, E.G. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *Journal of Molecular Medicine (Berl in)* , 87(4): 363 - 374, 2009.
- HARIKUMAR, K.B. & AGGARWAL, B.B. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic disease. *Cell Cycle*, 7(8): 1020 -1035, 2008.
- HARLIN, H.; REFFEY, S. B.; DUCKETT, C. S.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C. B. Characterization of XIAP-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10): 3604 -3608, 2001.
- HAUSER, H. P.; BARDROFF, M.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. A Giant Ubiquitin-conjugating Enzyme Related to IAP Apoptosis Inhibitors. *The Journal of Cell Biology*, 141(6): 1415 -1422, 1998.
- HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37: 614-636, 1965.
- HEMANN, M.T. & LOWE, S.W. The p53 - Bcl-2 connection. *Cell Death and Differentiation*, 13: 1256-1259, 2006.
- HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40: 2379-2383, 1992.

- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41: 1242-1246, 1993.
- HOLCIK, M. & KORNELUK, R.G. XIAP, the guardian angel. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7): 550 -556, 2001.
- HOLLAND, E.C. Gliomagenesis: Genetic Alterations and Mouse Models. *Nature Reviews Genetics*, 2: 120-129, 2001.
- HU, Y.; CHERTON-HORVAT, G.; DRAGOWSKA, V.; BAIRD, S.; KORNELUK, R. G.; DURKIN, J. P.; MAYER, L. D.; LACASSE, E. C. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 9(7): 2826 -2836, 2003.
- HUANG, Y.; PARK, Y. C.; RICH, R. L.; SEGAL, D.; MYSZKA, D. G.; WU, H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, 104(5): 781 -790, 2001.
- HUANG, Z.; CHENG, L.; GURYANOVA, O. A.; WU, Q.; BAO, S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein & Cell*, 1(7): 638 -655, 2010.
- HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12: 1543-1568, 2007.
- HUSZTHY, P. C.; GIROGLOU, T.; TSINKALOVSKY, O.; EUSKIRCHEN, P.; SKAFTNESMO, K. O., BJERKVIG, R.; VON LAER, D.; MILETIC, H. Remission of invasive, cancer stem-like glioblastoma xenografts using lentiviral vector-mediated suicide gene therapy. *PLoS One*, 4(7): e6314 , 2009.
- ISHII, N.; MAIER, D.; MERLO, A.; TADA, M.; SAWAMURA, Y.; DISERENS, A. C.; VAN MEIR, E. G. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology*, 9: 469-479, 1999.
- JEFFERS, J. R.; PARGANAS, E.; LEE, Y.; YANG, C.; WANG, J.; BRENNAN, J.; MACLEAN, K. H.; HAN, J.; CHITTENDEN, T.; IHLE, J. N.; MCKINNON, P. J.; CLEVELAND, J. L.; ZAMBETTI, G.P. Puma is an essential mediator of

- p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 4(4): 321-328, 2003.
- JEONG, J.C.; KIM, M.S.; JEONG, J. C.; KIM, M. S.; KIM, T. H.; KIM, Y. K. Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochemical Research*, 34(5): 991 -1001, 2009.
- JEYAPRAKASH, A. A.; KLEIN, U. R.; LINDNER, D.; EBERT, J.; NIGG, E. A.; CONTI, E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together." *Cell*, 131(2): 271 -285, 2007.
- JIANG, H.; WHITE, E. J.; CONRAD, C.; GOMEZ-MANZANO, C.; FUEYO, J. Autophagy Pathways in Glioblastoma. *Methods in Enzymology*, 453: 273-286, 2009.
- JIAO, B. H.; YAO, Z. G.; GENG, S. M.; ZUO, S. H. Expression of survivin, a novel apoptosis inhibitor and cell cycle regulatory protein, in human gliomas. *Chinese Medical Journal*, 117(4): 612 -614, 2004.
- JOHNSON, D.R. & O'NEILL, B.P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *Journal of Neuro-oncology*, 107 (2): 359 -364, 2012.
- JOZA, N.; SUSIN, S. A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W. L.; CHO, S. K.; LI, C. Y.; SASAKI, T.; ELIA, A. J.; CHENG, H. Y.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K. F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y. Y.; MAK, T. W.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549-554, 2001.
- KANG, D. W.; CHOI, C. H.; PARK, J. Y.; KANG, S. K.; KIM, Y. K. Ciglitazone induces caspase-independent apoptosis through down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochemical Research*, 33(3): 551-561.
- KANG, M. K. & KANG, S. K. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells and Development*, 16(5): 837 -847.

- KELLY, R. J.; LOPEZ-CHAVEZ, A.; CITRIN, D.; JANIK, J. E.; MORRIS, J. C. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Molecular Cancer*, 10: 35.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239-257, 1972.
- KHIDR, L. & CHEN, P.-L. RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene*, 25: 5210 - 5219, 2006.
- KIKUCHI, T.; SAITO, R.; SUGIYAMA, S.; YAMASHITA, Y.; KUMABE, T.; KRAUZE, M.; BANKIEWICZ, K.; TOMINAGA, T. Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. *Journal Neurosurgery*, 109(5): 867 -873, 2008.
- KIM, E. H.; KIM, H. S.; KIM, S. U.; NOH, E. J.; LEE, J. S.; CHOI, K. S. Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*, 24(46): 6877-6889, 2005.
- KIM, E. H.; KIM, S. U.; SHIN, D. Y.; CHOI, K. S. Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*, 23(2): 446 -456, 2004.
- KIM, W. Y. & SHARPLESS, N. E. The regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell*, 127: 265-275, 2006.
- KNUDSEN, E. S. & WANG, J. Y. J. Targeting the RB-pathway in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 16(4): 1094 -1099, 2010.
- KOCK, N.; KASMIER, R.; WEISSLEDER, R.; SHAH, K. Tumor Therapy Mediated by Lentiviral Expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia*, 9(5): 435 - 442, 2007.
- KRAKSTAD, C. & CHEKENIA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer*, 9(135) , 2010.
- KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.;

- MALORNI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G.; NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12(2): 1463 -1467, 2005.
- KUNDU, J.K. & SURH, Y.J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269: 243-261, 2008.
- KURATA, K.; YANAGISAWA, R.; OHIRA, M.; KITAGAWA, M.; NAKAGAWARA, A.; KAMIJO T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene*, 27: 741 - 754, 2008.
- KURZ, T.; TERMAN, A.; BRUNK, U.T. Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462: 220-230, 2007.
- LACASSE, E. C.; MAHONEY, D. J.; CHEUNG, H. H.; PLENCHETTE, S.; BAIRD, S.; KORNELUK, R. G. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48) : 6252-6275, 2008.
- LACASSE, E. C.; CHERTON-HORVAT, G. G.; HEWITT, K. E.; JEROME, L. J.; MORRIS, S. J.; KANDIMALLA, E. R.; YU, D.; WANG, H.; WANG, W.; ZHANG, R.; AGRAWAL, S.; GILLARD, J. W.; DURKIN, J. P. Preclinical Characterization of AEG35156/GEM640, a Second-Generation Antisense Oligonucleotide Targeting X-Linked Inhibitor of Apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 12(17) : 5231-5241, 2006.
- LAWLESS, C.; WANG, C.; JURK, D.; MERZ, A.; ZGLINICKI, T.; PASSOS JF. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology*, 45: 772-778, 2010.
- LAWRENCE, Y. R.; MISHRA, M. V.; WERNER-WASIK, M.; ANDREWS, D. W.; SHOWALTER, T. N.; GLASS, J.; SHEN, X.; SYMON, Z.; DICKER, A. P. Improving Prognosis of Glioblastoma in the 21st Century: Who Has Benefited Most? *Cancer*, 118(17):4228 -4234, 2012.
- LEMMON, M.A. & SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell*, 141(7): 1117-1134, 2010.

- LENS, S. M.; VADER, G.; MEDEMA, R. H. The case for Survivin as mitotic regulator. *Current Opinion in Cell Biology*, 18: 616-622, 2006.
- LENS, S. M.; WOLTHUIS, R. M.; KLOMPMAKER, R.; KAUW, J.; AGAMI, R.; BRUMMELKAMP, T.; KOPS, G.; MEDEMA, R. H. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *The EMBO Journal*, 22(12): 2934 -2947, 2003.
- LENZ, G. The RNA interference revolution. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(12): 1749 -1757, 2005.
- LESNIAK, M. S.; UPADHYAY, U.; GOODWIN, R.; TYLER, B.; BREM, H. Local Delivery of Doxorubicin for the Treatment of Malignant Brain Tumors in Rats. *Anticancer Research*, 25(6B): 3825 -3831, 2005.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 11(132): 27 -42, 2008.
- LEVINE, B. & YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2679 -2688, 2005.
- LI, F.; AMBROSINI, G.; CHU, E. Y.; PLESCIA, J.; TOGNIN, S.; MARCHISIO, P. C.; ALTIERI, D. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396(6711): 580 -584, 1998.
- LI, H.; ZHAO, Y.; PHILLIPS, H. I. A.; QI, Y.; LIN, T-Y.; SADLER, P. J.; O'CONNOR, P. B. Mass Spectrometry Evidence for Cisplatin As a Protein Cross-Linking Reagent. *Analytical Chemistry*, 83: 5369 - 5376, 2011.
- LI, T.K. & LIU, L.F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41: 53-77, 2001.
- LIMA, R. T.; MARTINS, L. M.; GUIMARÃES, J. E.; SAMBADE, C.; VASCONCELOS, M. H. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 11(5): 309 -316, 2004.
- LING, X.; BERNACKI, R. J.; BRATTAIN, M. G.; LI, F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15): 15196 -15203, 2004.

- LISTON, P.; FONG, W. G.; KELLY, N. L.; TOJI, S.; MIYAZAKI, T.; CONTE, D.; TAMAI, K.; CRAIG, C. G.; MCBURNEY, M. W.; KORNELUK, R. G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature Cell Biology*, 3(2):128 -133, 2001.
- LISTON, P.; FONG, W. G.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, 22: 8568 - 8580, 2003.
- LIU, C.; SAGE, J. C.; MILLER, M. R.; VERHAAK, R. G.; HIPPENMEYER, S.; VOGEL, H.; FOREMAN, O.; BRONSON, R. T.; NISHIYAMA, A.; LUO, L.; ZONG, H. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, 146(2): 209 -221, 2011.
- LIU, G.; YUAN, X.; ZENG, Z.; TUNICI, P.; NG, H.; ABDULKADIR, I. R.; LU, L.; IRVIN, D.; BLACK, K. L.; YU, J. S. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5: 67, 2006.
- LLEONART, M. E.; ARTERO-CASTRO, A.; KONDOH, H. Senescence induction; a possible cancer therapy. *Molecular Cancer*, 8: 3, 2009.
- LOPEZ, P. L.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; SILVA, A. O.; CORDERO, E. A.; GARCIA-SANTOS, D.; PELEGRINI, A. L.; REDER, G. M.; BARBIERI, N. L.; LENZ, G. Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) knock down. *Oncology*, 83(2):75 -82, 2012.
- LOUIS, D.N. Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annual Review of Pathology*, 1: 97-117, 2006.
- LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; WEBSTER.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C., JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(12) : 97-109, 2007.
- LU, X.; LEE, M.; BLOCK T. High level expression of apoptosis inhibitor in hepatoma cell line expressing Hepatitis B virus. *International Journal of Medical Science*, 2(1): 30 -35, 2005.
- LUNDBERG, A. S.; HANHN, W. C.; GUPTA, P.; WEINBERG, R. A. Genes involved in senescence and immortalization. *Current Opinion in Cell Biology*,12: 705-709, 2000.

- MA, J. J.; CHEN, B. L.; XIN, X. Y. XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 146(2): 222 -226, 2009.
- MAHER, E. A.; FURNARI, F. B.; BACHOO, R. M.; ROWITCH, D. H.; LOUIS, D. N.; CAVENEE, W. K.; DEPINHO, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*, 15(11): 1311 -1333, 2001.
- MAHMOOD, Z. & SHUKLA, Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Experimental Cell Research*, 316 (6) : 887-889, 2010.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 3(6) : 459-465, 2003.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future." *Nature Reviews Cancer* ,2(2): 143 -148, 2002.
- MARTÍNEZ, R. & CHACÓN-GARCIA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. *Current Medicinal Chemistry*, 12(2) : 127-151, 2005.
- MAYO, L. D.; DIXON, J. E.; DURDEN, D. L.; TONKS, N. K.; DONNER, D. B. PTEN Protects p53 from Mdm2 and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7): 5484 - 5489, 2002.
- MCMANUS, D. C.; LEFEBVRE, C. A.; CHERTON-HORVAT, G.; ST-JEAN, M.; KANDIMALLA, E. R.; AGRAWAL, S.; MORRIS, S. J.; DURKIN, J. P.; LACASSE, E. C. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene*, 23: 8105-8117, 2004.
- MELLO, J. A.; LIPPARD, S. J.; ESSIGMANN, J.M. DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry*, 34 (45) : 14783 - 14791, 1995.
- MERCER, E.A., KORHONEN, L., SKOGLÖSA, Y.; OLSSON, P-A.; KUKKONEN, J. P.; LINDHOLM, D. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons

- against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways . *The EMBO Journal*, 19(14): 3597 -3607, 2000.
- MILETIC, H.; FISCHER, Y. H.; NEUMANN, H.; HANS, V.; STENZEL, W.; GIROGLOU, T.; HERMANN, M.; DECKERT, M.; VON LAER, D. Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Human Gene Therapy*, 15(11): 1091 -1100, 2004.
- MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2): 185-229, 2004.
- MIRACCO, C.; COSCI, E.; OLIVERI, G.; LUZI, P.; PACENTI, L.; MONCIATTI, I.; MANNUCCI, S.; DE NISI, M. C.; TOSCANO, M.; MALAGNINO, V.; FALZARANO, S. M.; PIRTOLI, L.; TOSI, P. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *International Journal of Oncology*, 30(2): 429 -436, 2007.
- MIRZA, A.; MCGUIRK, M.; HOCKENBERRY, T. N.; WU, Q.; ASHAR, H.; BLACK, S.; WEN, S. F.; WANG, L.; KIRSCHMEIER, P.; BISHOP, W. R.; NIELSEN, L. L.; PICKETT, C. B.; LIU, S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 21: 2613-2622, 2002.
- MIYASHITA T. & REED, J.C. Tumor Suppressor p53 is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell*, 80(2): 293-299, 1995.
- MIYAZAKI, A.; KOBAYASHI, J.; TORIGOE, T.; HIROHASHI, Y.; YAMAMOTO, T.; YAMAGUCHI, A.; ASANUMA, H.; TAKAHASHI, A.; MICHIFURI, Y.; NAKAMORI, K.; NAGAI, I.; SATO, N.; HIRATSUKA, H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Science*, 102(2): 324 -329, 2011.
- MOHAPATRA, S.; CHU, B.; ZHAO, X.; PLEDGER, W. J. Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Reserch*, 65(17): 7717 -7723, 2005.

- MOLCHADSKY, A.; RIVLIN, N.; BROSH, R.; ROTTER, V.; SARIG, R. p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis*, 31(9): 1501 -1508, 2010.
- MONTECUCCO, A. & BIAMONTI, G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*, 252: 9 - 18, 2007.
- MUFTI, A.R.; BURSTEIN, E.; DUCKETT, C.S. XIAP: Cell Death regulation Meets copper Homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463(2): 168-174, 2007.
- MUFTI, A. R.; BURSTEIN, E.; CSOMOS, R. A.; GRAF, P. C.; WILKINSON, J. C.; DICK, R. D.; CHALLA, M.; SON, J. K.; BRATTON, S. B.; SU, G. L.; BREWER, G. J.; JAKOB, U.; DUCKETT, C. S. XIAP is a Copper Binding Protein Deregulated in Wilson's Disease and Other Copper Toxicosis Disorders. *Molecular Cell*, 21: 775-785, 2006.
- NAKAMURA, H.; KUMEI, Y.; MORITA, S.; SHIMOKAWA, H.; OHYA, K.; SHINOMIYA, K. Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl -2) and anti - apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector - averaged gravity condition. *Annals of the New York Academy of Science*, 1010: 143-147, 2003.
- NATSUMEDA, M.; AOKI, H.; MIYAHARA, H.; YAJIMA, N.; UZUKA, T.; TOYOSHIMA, Y.; KAKITA, A.; TAKAHASHI, H.; FUJII, Y. Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology*, 31(5):486 -93, 2011.
- NAUMANN, U.; BÄHR, O.; WOLBURG, H.; ALTENBEREND, S.; WICK, W.; LISTON, P.; ASHKENAZI, A.; WELLER, M. Adenoviral expression of XIAP antisense RNA induces apoptosis in glioma cells and suppresses the growth of xenografts in nude mice. *Gene Therapy*, 14: 147-161, 2007.
- Nern, C., Sommerlad, D., et al. (2009). "Brain tumor stem cells." *Recent Results in Cancer Res* 171: 241-259.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455 (7216) : 1061-1068, 2008.

- NIKOLOVSKA-COLESKA, Z.; XU, L.; HU, Z.; TOMITA, Y.; LI, P.; ROLLER, P. P.; WANG, R.; FANG, X.; GUO, R.; ZHANG, M.; LIPPMAN, M. E.; YANG, D.; WANG, S. Discovery of Embelin as a Cell-Permeable, Small-Molecular Weight Inhibitor of XIAP through Structure-Based Computational Screening of a Traditional Herbal Medicine Three-Dimensional Structure Database. *Journal of Medial Chemistry*, 47: 2430-2440, 2004.
- NOËL, G.; SCHOTT, R.; FROELICH, S.; GAUB, M. P.; BOYER, P.; FISCHER-LOKOU, D.; DUFOUR, P.; KEHRLI, P.; MAITROT, D. Retrospective comparison of chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy, with or without prior gliadel implantation (carmustine) after initial surgery in patients with newly diagnosed high-grade glioma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*: 1-7, 2011.
- ODA, E.; OHKI, R.; MURASAWA, H.; NEMOTO, J.; SHIBUE, T.; YAMASHITA, T.; TOKINO, T.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468): 1053-1058, 2000.
- OKADA, H. & MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 4(8): 592 -603, 2004.
- ORZÁEZ, M.; GORTAT, A.; SANCHO, M.; CARBAJO, R. J.; PINEDA-LUCENA, A.; PALACIOS-RODRÍGUEZ, Y.; PÉREZ-PAYÁ, E. Characterization of dequalinium as a XIAP antagonist that targets the BIR2 domain. *Apoptosis*, 16(5): 460 -467, 2011.
- PAN, E.; MITCHELL, S. B.; TSAI, J. R. A retrospective study of the safety of BCNU wafers with concurrent temozolomide and radiotherapy and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients. *Journal of Neuro-oncology*, 88(353-357) , 2008.
- PARK, S. J.; AHMAD, F.; PHILP, A.; BAAR, K.; WILLIAMS, T.; LUO, H.; KE, H.; REHMANN, H.; TAUSSIG, R.; BROWN, A. L.; KIM, M. K.; BEAVEN, M. A.; BURGIN, A. B.; MANGANIELLO, V.; CHUNG, J. H. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 148(3): 421 -433, 2012.

- PAVET, V.; PORTAL, M. M.; MOULIN, J. C.; HERBRECHT, R.; GRONEMEYER, H. Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene*, 30(1): 1 -20, 2010.
- POPE, W. B.; LAI, A.; NGHIEMPHU, P.; MISCHEL, P.; CLOUGHESY, T. F. MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology*, 66(8): 1258 - 1260, 2006.
- PROBST, B. L.; LIU, L.; RAMESH, V.; LI, L.; SUN, H.; MINNA, J. D.; WANG, L. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner. *Cell Death and Differentiation*, 17: 1645-1654, 2010.
- QIN, Y.; CHEN, H.; ZHANG, Q.; WANG, X.; YUAN, W.; KUAI, R.; TANG, J.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIU, J.; HE, Q. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. *International Journal of Pharmaceutics*, 420(2): 304 -312, 2011.
- REBBAA, A.; ZHENG, X.; CHOU, P. M.; MIRKIN, B. L. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22: 2805 - 2811, 2003.
- REDDY, J. P. & LI, Y. Oncogene-induced senescence and its role in tumor suppression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(3): 247-256, 2011.
- REITHMEIER, T.; GRAF, E.; PIROTH, T.; TRIPPEL, M.; PINSKER, M. O.; NIKKHAH, G. BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer*, 10: 30, 2010.
- RICCI-VITIANI, L.; PALLINI, R.; BIFFONI, M.; TODARO, M.; INVERNICI, G.; CENCI, T.; MAIRA, G.; PARATI, E. A.; STASSI, G.; LAROCCA, L. M.; DE MARIA, R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325): 824 -828, 2010.
- RICHTER, B. W. M.; MIR, S. S.; EIBEN, L. J.; LEWIS, J.; REFFEY, S. B.; FRATTINI, A.; TIAN, L.; FRANK, S.; YOULE, R. J.; NELSON, D. L.; NOTARANGELO, L. D.; VEZZONI, P.; FEARHEAD, H. O.; DUCKETT, C.

- S. Molecular Cloning of ILP-2, a Novel Member of the Inhibitor of Apoptosis Protein Family. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13): 4292 -4301, 2001.
- RIEDL, S. J. & SHI Y. Molecular Mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 5: 897-907, 2004.
- RIEDL, S. J.; RENATUS, M.; SCHWARZENBACHER, R.; ZHOU, Q.; SUN, C.; FESIK, S. W.; LIDDINGTON, R. C.; SALVESEN, G. S. Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104: 791-800, 2001.
- RIGAUD, S.; FONDANÈCHE, M. C.; LAMBERT, N.; PASQUIER, B.; MATEO, V.; SOULAS, P.; GALICIER, L.; LE DEIST, F.; RIEUX-LAUCAT, F.; REVY, P.; FISCHER, A.; DE SAINT BASILE, G.; LATOUR, S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 444: 110-114, 2006.
- ROBINSON, D. R.; WU, Y. M.; LIN, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49): 5548 -5557, 2000.
- ROTHER, M.; PAN, M. G.; HENZEL, W. J.; AYRES, T. M.; GOEDDEL, D. V. The TNFR2-TRAF Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Cell*, 83: 1243-1252, 1995.
- ROY, N.; MAHADEVAN, M. S.; MCLEAN, M.; SHUTLER, G.; YARAGHI, Z.; FARAHANI, R.; BAIRD, S.; BESNER-JOHNSTON, A.; LEFEBVRE, C.; KANG, X.; SALIH, M.; AUBRY, H.; TAMAI, K.; GUAN, X.; IOANNOU, P.; CRAWFORD, T. O.; JONG, P. J.; SURH, L.; IKEDA, J-E.; KORNELUK, R. G.; MACKENZIE, A. The Gene for Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy. *Cell*, 80: 167-178, 1995.
- RUCHAUD, S.; CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*, 131(2): 230 -231.
- RUMBLE, J. M. & DUCKETT, C. Diverse functions within the IAP family. *Journal of Cell Science*, 121(21): 3505 -3507, 2008.
- SALVESEN, G.S. & DUCKETT, C. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Molecular Cell Biology*, 3: 401-410, 2002.

- SALZ, W.; EISENBERG, D.; PLESCIA, J.; GARLICK, D. S.; WEISS, R. M.; WU, X. R.; SUN, T. T.; ALTIERI, D. C. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior. *Cancer Research*, 65(9): 3531 -3534, 2005.
- SCHASER, T.; WREDE, C.; DUERNER, L.; SLIVA, K.; CICHUTEK, K.; SCHNIERLE, B.; BUCHHOLZ, C. J. RNAi-mediated gene silencing in tumour tissue using replication-competent retroviral vectors. *Gene Therapy*, 18: 953-960, 2011.
- SCHIMMER, A.D. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Research*, 64(20): 7183 -7190, 2004.
- SCHIMMER, A. D.; WELSH, K.; PINILLA, C.; WANG, Z.; KRAJEWSKA, M.; BONNEAU, M. J.; PEDERSEN, I. M.; KITADA, S.; SCOTT, F. L.; BAILLY-MAITRE, B.; GLINSKY, G.; SCUDIERO, D.; SAUSVILLE, E.; SALVESEN, G.; NEFZI, A.; OSTRESH, J. M.; HOUGHTEN, R. A.; REED, J. C. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell*, 5(1) : 25-35, 2004.
- SCOTT, F. L.; DENAULT, J. B.; RIEDL, S. J.; SHIN, H.; RENATUS, M.; SALVESEN, G. S. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *The EMBO Journal*, 24: 645-655, 2005.
- SERRANO M.; LIN, A. W.; MCCURRACH, M. E.; BEACH, D.; LOWE, S. W. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5) : 593-602, 1997.
- SEVIM, H.; PARKINSON, J. F.; MCDONALD, K. L. Etoposide-mediated glioblastoma cell death: dependent or independent on the expression of its target, topoisomerase II alpha. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 137: 1705 - 1712, 2011.
- SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, S. B.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition & Food Research*, 115(53): 115 - 128, 2009.
- SHILOH, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31(7) : 402- 410, 2006.

- SHINGU, T.; YAMADA, K.; HARA, N.; MORITAKE, K.; OSAGO, H.; TERASHIMA, M.; UEMURA, T.; YAMASAKI, T.; TSUCHIYA, M. Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells. *Cancer Research*, 63(14): 4044-4047, 2003.
- SHINWARI, Z.; MANOGARAN, P. S.; ALROKAYAN, S. A.; AL-HUSSEIN, K. A.; ABOUSSEKHRA, A. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21WAF1 up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *Journal of Neuro-oncology*, 87: 123 - 132, 2008.
- SINGH, S. K.; HAWKINS, C.; CLARKE, I. D.; SQUIRE, J. A.; BAYANI, J.; HIDE, T.; HENKELMAN, R. M.; CUSIMANO, M. D.; DIRKS, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(396-401) , 2004.
- SINGH, S. K.; CLARKE, I. D.; HIDE, T.; DIRKS, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23(43): 7267 -7273, 2004.
- SONG, Z.; YAO, X.; WU, M. Direct Interaction between Survivin and Smac/DIABLO Is Essential for the Anti-apoptotic Activity of Survivin during Taxol-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25): 23130-23140, 2003.
- SORENSEN, C.M.; BARRY, M.A.; EASTMAN, A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 749 - 755, 1990.
- SPEE, B.; JONKERS, M. D.; ARENDS, B.; RUTTEMAN, G. R.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Specific down-regulation of XIAP with RNA interference enhances the sensitivity of canine tumor cell-lines to TRAIL and doxorubicin. *Molecular Cancer*, 5: 34, 2006.
- SRINIVASULA, S.M. & ASHWELL, J.D. IAPs: What's in a name? *Molecular Cell*, 30(2): 123 -135, 2008.
- STEINIGER, S. C.; KREUTER, J.; KHALANSKY, A. S.; SKIDAN, I. N.; BOBRUSKIN, A. I.; SMIRNOVA, Z. S.; SEVERIN, S. E.; UHL, R.; KOCK, M.; GEIGER, K. D.; GELPERINA, S. E. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles." *International Journal of Cancer*, 109: 759 - 767, 2004.

- STIEBER, V. W. & MEHTA, M. Advances in radiation therapy for brain tumors. *Neurologic Clinics*, 25: 1005-1033, 2007.
- STOKOE, D.; FURNARI, F. B.; VAN MEIR, E. G. The PTEN/PI3 kinase pathway in human glioma. *CNS Cancer Cancer Drug Discovery and Development*, 2: 315-357, 2009.
- STUPP, R.; HEGI, M. E.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; TAPHOORN, M. J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A. A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C. J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAEUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; MIRIMANOFF, R. O.; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOUR AND RADIATION ONCOLOGY GROUPS; NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10: 459-466, 2009.
- STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O.; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOR AND RADIOTHERAPY GROUPS; NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10): 987 -996, 2005.
- SYNTICHAKI, P. & TAVERNARAKIS, N. The Biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8) : 672-684, 2003.
- TAIT, S. W. G. & GRENN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11: 621-632, 2010.

- TAMM, I.; WANG, Y.; SAUSVILLE, E.; SCUDIERO, D. A.; VIGNA, N.; OLTERS DORF, T.; REED, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research*, 58(23): 5315 -5320, 1998.
- TANIGAWA S., FUJII M., HOU D.X. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(3): 797 -804, 2008.
- TONG, Q-S.; ZHENG, L-D.; WANG, L.; ZENG, F-Q.; CHEN, F-M.; DONG, J-H.; LU, G-C. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 12: 509-514, 2005.
- UDONO, M.; KADOOKA, K.; YAMASHITA, S.; KATAKURA, Y. Quantitative analysis of cellular senescence phenotypes using an imaging cytometer. *Methods*, 56(3) :383-388, 2012.
- VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H. & ZHIVOTOVSKY, B. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends in Cell Biology*, 20(3):150 -159.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; M. OLSSON; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*, 15(7): 1153 - 1162, 2008.
- VAN MEIR, E. G. CNS cancer: models, markers, prognostics factors, targets and therapeutic approaches. *Humana Press, Springer*, 2009.
- VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.;NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 60(3): 166-193, 2010.
- VANDENABEELE P. L. G.; BERGHE, T. M.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 700-714, 2010.
- VAUGHN, A. E. & DESHMUKH, M. Essential postmitochondrial function of p53 uncovered in DNA damage-induced apoptosis in neurons. *Cell Death and Differentiation*, 14(5): 973 -981, 2007.

- VELLANKI, S. H., GRABRUCKER, A., LIEBAU, S.; PROEPPER, C.; ERAMO, A.; BRAUN, V.; OECKERS, T.; DEBATIN, K. M.; FULDA, S. Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia*, 11(8): 743 -752, 2009.
- VENERE, M.; FINE, H. A.; DIRKS, P. B.; RICH, J. N. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia*, 59(8): 1148 -1154, 2011.
- VERDECIA, M. A.; HUANG, H.; DUTIL, E.; KAISER, D. A.; HUNTER, T.; NOEL, J. P. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature Structural Biology*, 7(7): 602 -608, 2000.
- VERREAULT, M.; STRUTT. D.; MASIN, D.; ANANTHA, M.; YUNG, A.; KOZLOWSKI, P.; WATERHOUSE, D.; BALLY, M. B.; YAPP, D. T. Vascular normalization in orthotopic glioblastoma following intravenous treatment with lipid-based nanoparticulate formulations of irinotecan (Irinophore C_{FF}), doxorubicin (Caelyx®) or vincristine." *BMC Cancer*, 11:124, 2011.
- VISVADER, J. E. & LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10): 755 -768, 2008.
- VOLONTE, D.; ZHANG, K.; LISANTI, M. P.; GALBIATI, F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7): 2502 -2517, 2002.
- VON HOLST, H.; KNOCHENHAUER, E.; BLOMGREN, H.; COLLINS, V. P.; EHN, L.; LINDQUIST, M.; NORÉN, G.; PETERSON, C. Uptake of Adriamycin in Tumour and Surrounding Brain Tissue in Patients with Malignant Gliomas. *Acta Neurochirurgica*, 104: 13-16, 1990.
- VOUSDEN, K. H. & PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3): 413 -431, 2009.
- VUCIC, D.; STENNICKE, H. R.; PISABARRO, M. T.; SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Current Biology*, 10(21): 1359 -1366, 2000.
- WAGENKNECHT, B.; GLASER, T.; NAUMANN, U.; KÜGLER, S.; ISENMANN, S.; BÄHR, M.; KORNELUK, R.; LISTON, P.; WELLER, M. Expression and

- biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell Death and Differentiation*, 6(4): 370 -376, 1999.
- WANG, T.H.; POPP, D. M.; WANG, H-S.; SAITOH, M.; MURAL, J. G.; HENLEY, D. C.; ICHIJOI, H.; WIMALASENA, J. Microtubule Dysfunction Induced by Paclitaxel Initiates Apoptosis through Both c-Jun N-terminal Kinase (JNK) -dependent and -Independent Pathways in Ovarian Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12): 8208 - 8216, 1999.
- WEI, Y.; FAN, T.; YU, M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. Inhibitor of apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40(4): 278 -288, 2008.
- WERTZ, I. E.; KUSAM, S.; LAM, C.; OKAMOTO, T.; SANDOVAL, W.; ANDERSON, D. J.; HELGASON, E.; ERNST, J. A.; EBY, M.; LIU, J.; BELMONT, L. D.; KAMINKER, J. S.; O'ROURKE, K. M.; PUJARA, K.; KOHLI, P. B.; JOHNSON, A. R.; CHIU, M. L.; LILL, J. R.; JACKSON, P. K.; FAIRBROTHER, W. J.; SESHAGIRI, S.; LUDLAM, M. J.; LEONG, K. G.; DUEBER, E. C.; MAECKER, H.; HUANG, D. C.; DIXIT, V. M. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 471: 110-114, 2011.
- WESTPHAL, M.; HILT, D. C.; BORTEY, E.; DELAVAUULT, P.; OLIVARES, R.; WARNKE, P. C.; WHITTLE, I. R.; JÄÄSKELÄINEN, J.; RAM, Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 5: 79-88, 2003.
- WILKINSON, J. C.; CEPERO, E.; BOISE, L. H.; DUCKETT, C. S. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16): 7003 -7014, 2004.
- WOHLFART, S.; KHALANSKY, A. S.; GELPERINA, S.; BEGLEY, D.; KREUTER, J. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood - brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 154: 103-107, 2011.
- WYNDFORD-THOMAS, D. Cellular Senescence and Cancer. *The Journal of Pathology*, 187: 100-111, 1999.
- XIE, D.; ZENG, Y. X.; WANG, H. J.; WEN, J. M.; TAO, Y.; SHAM, J. S. T.; GUAN, X. Y. Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and

- secondary human glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 94(1): 108 - 114, 2006.
- YANG, Y.; FANG, S.; JENSEN, J. P.; WEISSMAN, A. M.; ASHWELL, J. D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288(5467): 874 - 877, 2000.
- YU, S. C.; PING, Y. F.; YI, L.; ZHOU, Z. H.; CHEN, J. H.; YAO, X. H.; GAO, L.; WANG, J. M.; BIAN, X. W. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters*, 265(1): 124-134, 2008.
- YUAN, X.; CURTIN, J.; XIONG, Y.; LIU, G.; WASCHSMANN-HOGIU, S.; FARKAS, D. L.; BLACK, K. L.; YU, J. S. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23(58): 9392 -9400, 2004.
- YUNG, W.K., P. M., YAYA-TUR R, ROSENFELD SS, BRADA M, FRIEDMAN HS, ALBRIGHT R, OLSON J, CHANG SM, O'NEILL AM, FRIEDMAN AH, BRUNER J, YUE N, DUGAN M, ZAKNOEN S, LEVIN VA. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *Journal of Clinical Oncology*, 9: 2762-2771, 1999.
- ZAMIN, L. L.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; DILLENBURG-PILLA, P.; HORN, F.; SALBEGO, C.; LENZ, G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Science*, 100(9) : 1655-1662, 2009.
- ZHANG, M. & CHAKRAVARTI, A. Novel Radiation-Enhancing Agents in Malignant Gliomas. *Seminars in Radiation Oncology*, 16: 29-37, 2006.
- ZHANG, Q. B.; JI, X. Y.; HUANG, Q.; DONG, J.; ZHU, Y. D.; LAN, Q. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Research*, 16(12): 909 -915, 2006.
- ZHENG, X.; CUI, D.; XU, S.; BRABANT, G.; DERWAHL, M. Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: Characterization of resistant cells. *International Journal of Oncology*, 37(2) : 307-315, 2010.

Anexo

Patrícia Luciana da Costa Lopez
Curriculum Vitae

Maio/2012

Patrícia Luciana da Costa Lopez

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Patrícia Luciana da Costa Lopez
Nome em citações bibliográficas LOPEZ, P.; Lopez, Patricia L.; LOPEZ, P; Lopez, Patrícia Luciana da Costa; Lopez, Patrícia L. C.
Sexo feminino
Filiação Marcelo Hipólito Lopez e Isabel Ondina da Costa Lopez
Nascimento 17/01/1980 - Porto Alegre /RS - Brasil
Carteira de Identidade 3913815 SSP - SC - 18/12/2008
CPF 007.101.949-94

Endereço residencial RUA LOBO DA COSTA 244 / 201
AZENHA - Porto Alegre
90050-110, RS - Brasil
Telefone: 51 3022-1588
Celular: 91763279

Endereço profissional Colégio Província de São Pedro
Rua Marechal Andréas 345
91340-400, Porto Alegre, RS
Telefone: 51 3328-2810

URL da home page:

<http://www.colegioprovincia.com.br/apresentacao.aspx>

<http://www.ufrgs.br/labsinal/index.htm>

Endereço eletrônico

e-mail para contato : patilu17@yahoo.com.br

e-mail alternativo : patilu17@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007 –** Doutorado em Biologia Celular e Molecular. (conclusão prevista para junho de 2012)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs In Glioma Cells
Orientador: Guido Lenz
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: Apoptose, TERAPIA GÊNICA, TERAPIA CELULAR, câncer, gliomas
- 2004 - 2006** Graduação em LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 1999 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS R213R E 13494G->A DO GENE P53 EM INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÃO ESOFÁGICA COMPARADOS COM UM GRUPO CONTROLE
Orientador: SANDRA LEISTNER-SEGAL E ROBERTO GIUGLIANI
-

Formação complementar

2009 - 2009	Curso de curta duração em How to write a good english language paper. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Curso de Citometria de Fluxo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil <i>Palavras-chave: citometria</i>
2006 - 2006	Extensão universitária em II LATINAMERICAN SCHOOL OF HUMAN AND MEDICAL GENET. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em „X Mandatory Training and Orientation on the Use an. SAINT LOUIS UNIVERSITY, SLU, Estados Unidos
2005 - 2005	Curso de curta duração em „X Mandatory Training and Orientation on the Use an. SAINT LOUIS UNIVERSITY, SLU, Estados Unidos
2004 - 2004	Curso de curta duração em Terapia Celular E Manipulação Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2003 - 2003	Terapia Gênica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Curso Genética Epidemiológica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta duração em II Curso de Biologia Molecular. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

Áreas de atuação

1. Citologia e Biologia Celular
2. TERAPIA GÊNICA
3. Biologia Molecular
4. Bioquímica
5. Genética Humana e Médica
6. Educação

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente
Espanhol	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
Português	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Lopez, Patrícia L. C. ; Villodre, Emilly Schlee ; FILIPPI-CHIELA, E. ; SILVA, A. O. ; CORDERO, E. ; Santos, Daniel Garcia ; PELEGRINI, Alessandra L ; BARBIERI, N. ; Lenz, Guido . Sensitization of glioma cells by X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) knock down. *Oncology (Basel)* **JCR**, 2012.

2. Andrade, Cláudia M. B., Lopez, Patrícia L. C., Noronha, Bruno T., Wink, Márcia R., Borojevic, Radovan, Margis, Rogério, Lenz, Guido, Battastini, Ana Maria O., Guma, Fátima C. R. Ecto-5?-nucleotidase/CD73 knockdown increases cell migration and mRNA level of collagen I in a hepatic stellate cell line. *Cell and Tissue Research (Print)*. , v.344, p.279 - 286, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [doi:10.1007/s00441-011-1140-7]

3. PILGER, Diogo André, Lopez, Patrícia Luciana da Costa, SEGAL, Fábio, Leistner-Segal, Sandra Analysis of R213R and 13494 G?A polymorphisms of the p53 gene in individuals with esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus compared with a control group. *Genomic Medicine*. , v.1, p.57 - 63, 2007.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

4. PILGER, Diogo André, LOPEZ, P., Segal, Fábio, Leistner-Segal, Sandra Molecular Analysis of the p53 Gene in Patients with Intestinal Metaplasia of the Cardia and Barrett's Esophagus: Characterization by Sequencing. *Digestive Diseases and Sciences*. , v.52, p.2183 - 2185, 2007.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

5. SHUNJII, T, MONTANO, AM, LOPEZ, P., TRANDAFIRESCU, GG, GUTIERREZ, MA, OIKAWA, H., NISHIOKA, T, VIEIRA, M. B., ORII, T, NOGUSHI, A Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene.. *Molecular Genetics and Metabolism*. , v.XXXXXX, p.XXXXX - , 2006.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=retrieve&dopt=abstractplus&list_uids=16837223&query_hl=1&itool=pubmed_docsum]

6. NISHIOKA, T, TOMASU, S, GUTIERREZ, MA, MIYAMOTO, K., TRANDAFIRESCU, G. G., LOPEZ, P., GRUBB, J. H., KANAI, R., KOBAYASHI, H., SLY, W. S. Enhancement of drug delivery to bone: Characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide.. *Molecular Genetics and Metabolism*. , v.88, p.244 - 255, 2006.

Referências adicionais : Inglês.

7. LEISTNERSEGAL, S, KASPARY, A, LOPEZ, P, PILGER, D, SEGAL, F TP53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett esophagus. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. , v.170, p.76 - 77, 2006.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.03.017]

8. SHUNJII, T, MONTANO, AM, NISHIOKA, T, GUTIERREZ, MA, PENA, OM, TRANDAFIRESCU, GG, LOPEZ, P., YAMAGUSHI, S, ORII, T Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A).. *Human Mutation*. , v.26, p.500 - 512, 2005.

Palavras-chave: GALNS, mucopolysaccharidosis IVA

Referências adicionais : Inglês. Home page: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&dopt=abstract&list_uids=16287098&query_hl=1&itool=pubmed_docsum]

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. LOPEZ, P., PILGER, Diogo André, SEGAL, Sandra Leistner, SEGAL, Fábio
ANALISE DOS POLIMORFISMOS R213R E 13494G>A DO GENE P53 EM PACIENTES COM
SUSPEITA DE ESÔFAGO DE BARRET E POPULAÇÃO CONTROLE In: 50º CONGRESSO
BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2004, FLORIANÓPOLIS.

**ANALISE DOS POLIMORFISMOS R213R E 13494G>A DO GENE P53 EM PACIENTES COM
SUSPEITA DE ESÔFAGO DE BARRET E POPULAÇÃO CONTROLE.** , 2004.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. ITURRIETA, Luciano, PUJOL, Clarissa, LOPEZ, P., PILGER, Diogo André, SEGAL, Fábio,
SEGAL, Sandra Leistner
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE MOLECULAR DO GENE P53 PARA
IDENTIFICAÇÃO DE PERDA DE HETEROZIGOSIDADE, MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS EM
ADENOCARCINOMAS DE ESÔFAGO In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA,
2003, PORTO ALEGRE.

. , 2003.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica, Genética

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. LOPEZ, P., PILGER, Diogo André, SEGAL, Fábio, SEGAL, Sandra Leistner
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO GENE
P53 In: 49º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2003, ÁGUAS DE LINDÓIA.

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO
GENE P53.** , 2003.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica, Genética

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

4. LOPEZ, P., PILGER, Diogo André, SEGAL, Sandra Leistner
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO GENE
P53 In: XV SALÃO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, PORTO ALEGRE.

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO
GENE P53.** , 2003.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

5. LOPEZ, P., FONSECA, Reanta, ZACHARIAS, Enzo, DEONÍZIO, Janyana, VIOLA, Giordano,
XAVIER, Léder, FRANCI, Janete, CUNHA, Cláudio, FERRAZ, Anete, ELENA, Matilde Achaval
EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE A IMUNORREATIVIDADE DA TIROSINA HIDROXILASE (TH)
NA SUBSTÂNCIA NIGRA DE RATAS TRATADAS COM 6-OHDA In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA, 2002, PORTO ALEGRE.

. , 2002.

Áreas do conhecimento : Histologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, A. O., LOPEZ, P., LENZ, G.

Knockdown of XIAP Cooperates with the Overexpression of P53 in Reducing Cell Proliferation and
Enhancing Cell Death in Gliomas In: American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010,
Philadelphia.

**Knockdown of XIAP Cooperates with the Overexpression of P53 in Reducing Cell
Proliferation and Enhancing Cell Death in Gliomas.** , 2010.

Palavras-chave: cancer therapeutics

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Vários Home page:
[http://www.ascb.org/meetings/pdf/abstracts50/pdf/2010_Regular_Abtracts.pdf]

Apresentação de resumo e pôster.

2. LOPEZ, P, FILLIPI-CHIELA, E. C., CORDEIRO, E. A. A., SANTOS, D. G., REDER, G. M.,
LENZ, G.

XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs In Glioma Cells In: The American
Society of Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010, Philadelphia.

XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs In Glioma Cells. , 2010.

Palavras-chave: cancer therapeutics

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: VáriosHome page:
[http://www.ascb.org/meetings/pdf/abstracts50/pdf/2010_Regular_Abstracts.pdf]
Apresentação de resumo e pôster.

3. José, Andres, Melissa, LENZ, G., Andrew, LOPEZ, P.

Creation of Lentiviral Vector Serie for Stable and Regulated Transduction In: XXXVIII Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, ÁGUAS DE LINDÓIA.

Creation of Lentiviral Vector Serie for Stable and Regulated Transduction. , 2009.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio magnético

4. LOPEZ, P., Andrew, FILLIPI-CHIELA, E. C., Lauren, LENZ, G.

RNA Interference of the Caspase Inhibitors XIAP and Survivin Modulate Apoptosis in Glioma In: XXXVIII Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, ÁGUAS DE LINDÓIA.

RNA Interference of the Caspase Inhibitors XIAP and Survivin Modulate Apoptosis in Glioma. , 2009.

Palavras-chave: apoptosis, gliomas, lentiviral vector

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio magnético

5. Andrew, LOPEZ, P, LEDUR, P. F., LENZ, G.

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE DE XIAP POR RNA DE INTERFERÊNCIA EM LINHAGENS DE GLIOMA U87 In: XX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008, PORTO ALEGRE.

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE DE XIAP POR RNA DE INTERFERÊNCIA EM LINHAGENS DE GLIOMA U87. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

6. Andrew, Lopez, Patricia L., LEDUR, P. F., LENZ, G.

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE DE SURVIVINA POR RNAi EM LINHAGENS DE GLIOMA U87 In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007

AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE DE SURVIVINA POR RNAi EM LINHAGENS DE GLIOMA U87. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

7. LOPEZ, P., PILGER, Diogo André, SEGAL, Fábio, SEGAL, Sandra Leistner

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO GENE P53 In: 10º CONGRESSO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SAÚDE DO MERCOSUL, 2003, PORTO ALEGRE.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO ENVOLVENDO OS EXONS 5 AO 8 DO GENE P53. , 2003.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8. PILGER, Diogo André, ITURRIETA, Luciano, SEGAL, Fábio, LOPEZ, P., SEGAL, Sandra Leistner

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR DO GENE P53 PARA IDENTIFICAÇÃO DE PERDA DE HETEROZIGOSIDADE, MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS EM ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO In: 10º CONGRESSO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SAÚDE DO MERCOSUL, 2003, PORTO ALEGRE.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR DO GENE P53 PARA IDENTIFICAÇÃO DE PERDA DE HETEROZIGOSIDADE, MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS EM ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO. , 2003.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de Trabalho

1. Andrew, LOPEZ, P., LENZ, G.

Knockdown of XIAP Cooperates with the Overexpression of P53 in Reducing Cell

Proliferation and Enhancing Cell Death in Gliomas, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: VáriosHome page: http://www.ascb.org/meetings/pdf/abstracts50/pdf/2010_Regular_Abstracts.pdf; Evento: American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting; Inst.promotora/financiadora: The American Society for Cell Biology

2. LOPEZ, P, FILLIPI-CHIELA, E. C., CORDEIRO, E. A. A., SANTOS, D. G., REDER, G. M., LENZ, G.

XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs In Glioma Cells, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: http://www.ascb.org/meetings/pdf/abstracts50/pdf/2010_Regular_Abstracts.pdf; Local: Convention Center Philadelphia; Cidade: Philadelphia; Evento: ASBC Annual Meeting 2010; Inst.promotora/financiadora: American Society for Cell Biology (ASBC)

3. José, Andres, Melissa, LENZ, G., Andrew, LOPEZ, P.

Creation of a Lentiviral Vector Series for Stable and Regulated Transduction, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel Monte Real; Cidade: Águas de Lindóia - SP; Evento: XXXVIII Annual Meeting of SBBq; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Bioquímica

4. LOPEZ, P., Andrew, Eduardo, José, Lauren, LENZ, G.

RNA Interference of the Caspase Inhibitors XIAP and Survivin Modulate Apoptosis in Glioma, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: gliomas, lentiviral vector, apoptosis

Áreas do conhecimento : TERAPIA GÊNICA

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel Monte Real; Cidade: Águas de Lindóia - SP; Evento: XXXVIII Annual Meeting of SBBq; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Bioquímica

5. LEDUR, P. F., LOPEZ, P, Emily, Andrew, Melissa, LENZ, G.

Apoptosis modulation in gliomas by RNA interference and transgene expression using Lentiviral vector, 2007. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: SÃO PAULO; Cidade: SÃO PAULO; Evento: São Paulo Research Conferences

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. Alessandra, Nicole, LOPEZ, P.

Microorganismos: Mocinhos ou Bandidos, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: educação em ciências

Referências adicionais : Brasil/Português. 50 horas. Meio de divulgação: Vários

2. Alessandra, Nicole, Andrew, LOPEZ, P.

Microorganismos: O mundo que não enxergamos, 2009. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: educação em ciências

Referências adicionais : Brasil/Português. 50 horas. Meio de divulgação: Vários

3. antônio carlos burlamaque, LOPEZ, P., valeska lizzi lagranha, Baldo, G, matias eliseo melendez, fernanda dos santos oliveira, fernanda dos santos pereira, BELARDINELLI, M. C.

ATUALIZAÇÃO EM TERAPIAS GÊNICA E CELULAR, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: TERAPIA GÊNICA, TERAPIA CELULAR

Referências adicionais : Brasil/Português. 15 horas. Meio de divulgação: Impresso

4. Kindel, E, LOPEZ, P.

RELATOS ILUSTRADOS DA EXPERIÊNCIA DOCENTE NA PRÁTICA DE ENSINO DA

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas. Meio de divulgação: Outro

Orientações e Supervisões

Orientação de outra natureza

1. Gleice Monteiro Reder. **Metodologias em Cultivo Celular**. 2010. Orientação de outra natureza (Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Referências adicionais : Brasil/Português.

Estágio supervisionado I.

2. Felipe de Almeida Sassi. **RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR COM ÊNFASE EM BIOLOGIA MOLECULAR**. 2010. Orientação de outra natureza (biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-chave: câncer, gliomas, Células tronco tumorais

Referências adicionais : Brasil/Português.

Estágio curricular.

Demais Trabalhos

1. Kindel, E, LOPEZ, P.

Relato Ilustrado da experiência docente na Prática de Ensino da Licenciatura em Ciências Biológicas da UFRGS, 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. LOPEZ, P., SANTOS, Eliane Kaltchuk dos, SHIENGOLD, Marion, GONÇALVES, Gislene Lopes **E POR FALAR EM GENÉTICA**, 2003.

Palavras-chave: GENÉTICA; EDUCAÇÃO

Áreas do conhecimento : Genética, Genética Humana e Médica

Setores de atividade : Educação Média de Formação Geral

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

PARTICIPAÇÃO COMO MEMBRO DA COMISSÃO ORGANIZADORA DA ATIVIDADE DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA "E POR FALAR EM GENÉTICA..." PROMOVIDA PELO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, NUM TOTAL DE 45 HORAS.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting**, 2010. (Encontro)

XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs In Glioma Cells.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII Reunião Anual da FeSBE**, 2008. (Congresso)
EFEITO DO SILENCIAMENTO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA MIGRAÇÃO CELULAR DE LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U138-MG.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2007. (Outra)
AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE DE SURVIVINA POR RNAI EM LINHAGENS DE GLIOMAS U87.

4. **CICLO DE PALESTRAS EM TERAPIA GÊNICA**, 2007. (Simpósio)

.

5. **II Jornada Acadêmica de Biomedicina da FFFCMPA**, 2006. (Outra)

II JORNADA ACADÊMICA DE BIOMEDICINA DA FFFCMPA.

6. **Simpósio Pesquisa Pré-Clínica e Clínica em Terapia Gênica e Celular**, 2006. (Simpósio) pesquisa básica, pré-clínica e clínica em terapia gênica e celular.

7. Apresentação (Outras Formas) no(a) **CURSO TEÓRICO DE INTRODUÇÃO À TERAPIA GÊNICA**, 2004. (Outra)

CURSO TEÓRICO DE INTRODUÇÃO À TERAPIA GÊNICA.

Áreas do conhecimento : *TERAPIA GÊNICA*

8. **Curso de Genética Epidemiológica**, 2003. (Outra)

CURSO DE GENÉTICA EPIDEMIOLÓGICA.

9. Apresentação Oral no(a) **XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2003. (Outra)

XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.

Áreas do conhecimento : *Genética Humana e Médica, Genética, educação*

Setores de atividade : *Cuidado À Saúde das Populações Humanas*

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **23º SEMANA CIENTÍFICA**, 2003. (Congresso)

10º CONGRESSO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SAÚDE DO MERCOSUL.

Áreas do conhecimento : *Neurologia, Genética, BIOÉTICA*

Setores de atividade : *Saúde Humana*

11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **49º congresso nacional de genética**, 2003. (Congresso)

49º congresso nacional de genética.

Palavras-chave: *gene p53, polimorfismo*

Áreas do conhecimento : *Genética, Genética Humana e Médica, educação*

12. **DISCUSSÃO SOBRE PESQUISA UTILIZANDO CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**, 2003. (Outra)

Áreas do conhecimento : *Genética Humana e Médica, Genética*

13. Apresentação Oral no(a) **salão de iniciação científica**, 2002. (Outra)

Análise do polimorfismos R213R do gene TP53.

Áreas do conhecimento : *Histologia*

14. Simposiasta no(a) **E POR FALAR EM GENÉTICA...**, 2002. (Oficina)

OFICINA SOBRE CLONAGEM.

Palavras-chave: *CLONAGEM*

Áreas do conhecimento : *Genética, Genética Humana e Médica*

15. **II CURSO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA A MEDICINA**, 2002. (Outra)

Áreas do conhecimento : *Medicina, Genética, TERAPIA GÊNICA*

16. **22ª SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA - VII CURSO DE INTRODUÇÃO À BIOÉTICA**, 2002. (Congresso)

Áreas do conhecimento : *Genética Humana e Médica, Genética*

Setores de atividade : *Cuidado À Saúde das Pessoas*

Organização de evento

1. LOPEZ, P., Santos, G, Goldim, M, Baldo, G

I Curso de Manipulação Genética, 2005. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : *Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Hipertexto*

2. LOPEZ, P.

CURSO TEÓRICO DE INTRODUÇÃO À TERAPIA GÊNICA, 2004. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

3. SANTOS, Eliane Kaltchuk dos, SHIENGOLD, Marion, LOPEZ, P., GONÇALVES, Gislene Lopes
E POR FALAR EM GENÉTICA, 2004. (Outro, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : educação, Genética

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

4. LOPEZ, P.

ATIVIDADE DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA E POR FALAR EM GENÉTICA, 2003. (Outro,
Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	7
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	13
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	4
Apresentações de Trabalhos (Simpósio).....	1

Produção Técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	1
Curso de curta duração ministrado (aperfeiçoamento).....	1
Curso de curta duração ministrado (especialização).....	1
Curso de curta duração ministrado (outro).....	1

Orientações

Orientação concluída (orientação de outra natureza).....	2
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	4
Participações em eventos (simpósio).....	2
Participações em eventos (oficina).....	1
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	8
Organização de evento (outro).....	4

Demais trabalhos relevantes

Demais trabalhos relevantes.....	2
----------------------------------	---

Técnicas que domina

PCR, RT-PCR e qRT-PCR
Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida, SDS-PAGE
Western Blot, Imunodeteção
Dosagem de Proteínas
Atividade Enzimática
Extração de DNA de sangue total
Extração de DNA de tecido
Purificação de Proteínas
Extração de DNA plasmidial
Quantificação de DNA e RNA
Cultivo de células animais
Transfecção
Transdução com vetor Lentiviral
Citometria de fluxo

Outras atividades profissionais

- Gelre Trabalho Temporário S/A (Praça General Osório,379 – 2º andar – Curitiba, PR) – auxiliar administrativo – Exerci funções no Setor de Sindicância da Brasil Telecom Paraná, em análise de faturas reclamadas por clientes da mesma. (de 25/09/2000 a 25/10/2000) Afastamento para realização de cursos de interesse da empresa.
- Gelre Trabalho Temporário S/A – auxiliar administrativo I – Ainda na Brasil Teelcom Paraná, passe a função de atendente de call center, fazendo atendimento a clientes que necessitavam de esclarecimento de suas faturas telefônicas. (25/11/2000 a 05/04/2001) Me afastei da empresa por motivos de mudança da cidade de Curitiba-PR para Porto Alegre-RS.
- Colégio Província de São Pedro – Porto Alegre – Professora substituta de Biologia de 8ª série do Ensino Fundamental e 1º ano do Ensino Médio, com carga horária de 12 horas semanais. (01/08/2011-13/12/2011)
- Colégio Província de São Pedro – Porto Alegre – Professora de Ciências e Biologia de 6ª e 7ª série do Ensino Fundamental e 1º e 2º e pré-vestibular do Ensino Médio, com carga horária de 29 horas semanais. (13/12/2011-atual)