

**Luís Francisco Zirnberger Batista**

**Mecanismos de indução de apoptose pela  
presença de danos ao DNA:**

**Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de  
células de glioma a agentes quimioterápicos**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em  
Ciências (Microbiologia).**

**São Paulo**

**2008**

**Luís Francisco Zirnberger Batista**

**Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA:**

**Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck**

**São Paulo**

**2008**

Dedicado à memória do meu pai

Dedicado à minha mãe, uma mulher que  
levanta, sacode a poeira e dá a volta por  
cima

## Agradecimentos

Muito aconteceu durante o período em que trabalhava nesta tese. Se hoje consegui terminá-la foi sem dúvida alguma devido ao teu apoio Pati, que me ajudou em todos os aspectos que possam existir, principalmente emocionalmente e intelectualmente. Pati, só você sabe tudo o que passei, tudo o que passamos; tenho a certeza de que sem você nada disto estaria acontecendo. Você é tudo para mim, e espero fazer por merecer tê-la ao meu lado.

Termino este doutoramento com a certeza de que a ciência torna-se a cada dia mais importante para a sobrevivência da nossa espécie. Fico feliz em poder participar disso e não poderia deixar de agradecer às pessoas que me “moldaram” cientificamente e me fizeram ter ainda mais a certeza que esta é uma batalha que vale a pena lutar! Em primeiro lugar, o Prof. Carlos Menck, pessoa que mais me ensinou sobre o que é Biologia, e como se deve trabalhar com ela. À Dra. Vanessa Chiganças, que me ensinou tudo o que sei sobre morte celular e com a qual aprendi a importância de “manter o foco” durante o longo período do Doutorado. Aos Drs. Alysson Muotri e Rodrigo Galhardo, por me fazerem ver que grandes idéias só aparecem a quem trabalha por elas.

A todas as pessoas do laboratório de Reparo de DNA, onde juntos passamos tantos bons momentos. Alexandre, Alice, André, Apuã, Bárbara, Carol Quayle, Douglas Juliana, Marinalva, Maria Helena, Rafaela, Renata Medina, Regina, Tomás, Vá Sato, Vinagrete e Wanessa, muito obrigado! Um agradecimento em particular aos veteranos das células, que tanta paciência tiveram comigo, e que tanto me ajudaram nestes anos: Carol Berra, Carol Marchetto, Dani, Helots, Kero, Renatinha, Ricardo e Tatiana. E em especial à Melissa, que além de tudo isso ainda colou grau para mim, enquanto eu estava na Alemanha! E claro, também ao pessoal da sessão cinema, Raquel e Stephano! E claro, as caronas da Luciana, sempre uma maneira divertida de terminar o dia!

Os períodos na Alemanha fizeram mais do contribuir para a minha formação científica. Fizeram-me também ver que por trás de uma fachada séria e compenetrada, existem algumas das pessoas mais alegres que já conheci. Jamais terei palavras para agradecer aos Profs. Bernd Kaina e Gerhard Fritz e seus respectivos grupos, por me fazerem sentir em casa, mesmo quando estava no “suicide room”! Um agradecimento especial ao Dr. Wynand Roos, que além de ser meu maior parceiro científico, é um grande amigo! E jamais poderia esquecer-me de agradecer à Tina, Eva e Steffen, por tantos bons momentos, em especial uma determinada viagem a Berlin, da qual jamais esquecerei.

Ah, tenho também que agradecer ao pessoal da “Bio 2000”, em especial às portuguesas, Cecília, Lia, Sandra, Vanessa e Zanith! E claro, Luiz, Lucas, Pedroca e Polonês, apesar de vocês terem prejudicado minha média ponderada, agradeço muito por toda a diversão proporcionada!

Aos companheiros de República: Zen, Roger, Wendell, Bixo, Primo e Gerson, por tantas pizzas compartilhadas por tanto tempo!

E, sem dúvida alguma, o maior agradecimento de todos vai para a minha família: minha esposa Patrícia, minha mãe Elenice, Ulysses, avó Dirce, tia Egle, tio Joaquim, Paulo e Rosa, Andrea, Luiz Paulo e Phillipe. Tenho a certeza de que sempre poderemos contar uns com os outros, em qualquer situação. E essa certeza vem do fato de saber que fomos todos criados no ombro de um gigante! Seu Francisco, que não era biólogo, mas sabia mais da vida do que qualquer um que já conheci. Obrigado Vô.

Agradeço também à Universidade de São Paulo, seus docentes e funcionários, que proporcionaram a melhor estrutura possível para a realização desta Tese. Espero fazer jus aos diplomas que carrego. E claro, agradeço à FAPESP e à Capes, pelo apoio financeiro recebido durante meu Doutorado.

Estes romanos são loucos!  
(Obelix, gaulês)

## Resumo

BATISTA, LFZ. Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A geração de lesões ao DNA possui diversos efeitos biológicos em células de mamíferos, como inibição da replicação e transcrição do DNA, ativação de vias de reparo de DNA, ativação de mecanismos “checkpoints”, mutagênese e indução de morte celular por apoptose. Este último pode ter conseqüências deletérias para o organismo, como no caso de doenças neurodegenerativas, mas também pode trazer benefícios, como impedir que uma célula com mutações seja perpetuada, possivelmente dando origem a um tumor. Apesar de extensivamente estudado, há ainda muito por se descobrir sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela indução e efetuação de morte celular por apoptose após a geração de danos ao DNA. Um dos agentes genotóxicos capazes de induzir apoptose é a luz ultravioleta (UV), cuja sinalização para este tipo de morte celular parece estar relacionada com o bloqueio da maquinaria de transcrição frente a uma lesão ao DNA. Neste trabalho iremos demonstrar que a replicação do DNA lesado é também um evento necessário para indução de apoptose por luz UV, e que a inibição dessa replicação é capaz de evitar a morte celular mesmo em células incapazes de reparar as lesões geradas pela irradiação. Será mostrado também que os agentes quimioterápicos Temozolomida (TMZ), Nimustina (ACNU), Carmustina (BCNU) e Fotemustina são capazes de induzir apoptose em células de glioblastoma multiforme (GBM) humano, em um processo controlado por *p53*. Se após tratamento com TMZ, *p53* sensibiliza células à indução de apoptose pela regulação da expressão de genes pró-apoptóticos, após tratamento com ACNU/BCNU/Fotemustina *p53* inibe a indução de morte celular, através da regulação da via de reparo responsável por remover as lesões geradas por estes agentes. Além disso, *p53* determina a via apoptótica utilizada por células de glioma tratadas com agentes quimioterápicos, já que células selvagens para este gene executam apoptose preferencialmente pela via extrínseca e células mutadas o fazem exclusivamente pela via intrínseca. As conseqüências destes resultados para a quimioterapia de pacientes com GBM também serão discutidas.

**Palavras-chave:** Reparo de DNA. Apoptose. Luz UV. Glioma. Quimioterapia.

## Abstract

BATISTA, LFZ. Mechanisms of apoptosis induction by DNA damage: a study on the role of p53 to the resistance that glioma cells present to chemotherapeutical agents. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Induction of DNA lesions leads to several different endpoints in mammalian cells, such as replication and transcription inhibition, activation of DNA repair pathways, induction of checkpoint mechanisms, mutagenesis and induction of cell death by apoptosis. Although apoptosis induction might be involved in deleterious conditions such as neurodegenerative diseases, it can also bring benefit, as for instance to avoid the uncontrolled propagation of a mutated cell. Albeit being extensively studied, the molecular mechanisms leading to apoptosis induction by DNA damage still remain largely under covered. One of the most extensively studied agents leading to apoptosis induction is ultraviolet light (UV), whose cell-death induction trigger seems to be related to the blockage of the RNA transcription machinery at the site of a lesion. This work provides evidence that the replication of damaged –DNA also works as a trigger for UV-induced apoptosis. Surprisingly, even in DNA repair-deficient cells the inhibition of damaged-DNA replication is able to protect from apoptosis induction. This work also indicates that the chemotherapeutical agents Temozolomide (TMZ), Nimustine (ACNU), Carmustine (BCNU) and Fotemustine are able to trigger apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM) cells, in a manner tightly controlled by *p53*. If after TMZ treatment *p53* sensitizes cells to apoptosis induction through the regulation of pro-apoptotic genes, after treatment with ACNU/BCNU/Fotemustine *p53* inhibits the induction of cell death, by enhancing the repair efficiency of the DNA lesions generated by those agents. On top of that, *p53* also regulates the apoptotic pathway that glioma cells utilize after treatment with those agents, since on the one hand *p53* wild-type cells dye preferentially trough the activation of the extrinsic pathway, and on the other hand *p53*-mutated cells undergo apoptosis exclusively trough the intrinsic pathway. The clinical considerations of these results will also be discussed.

**Key-words:** DNA repair. Apoptosis. UV light. Glioma. Chemotherapy.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Principais agentes físicos e químicos capazes de danificar a estrutura do DNA.....	20
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de formação de ICLs após tratamento com cloroetilnitrosoureas. ....	26
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo da via NER.....	31
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de reparo de ICLs.....	38
<b>Figura 5:</b> Efeito da afidicolina na síntese de DNA.....	65
<b>Figura 6:</b> Efeito da afidicolina e da luz UV na síntese de RNA.....	66
<b>Figura 7:</b> Sincronização de células CHO-9 por duplo bloqueio com afidicolina.....	67
<b>Figura 8:</b> Sobrevivência monoclonal após irradiação UV.....	69
<b>Figura 9:</b> Afidicolina inibe apoptose induzida por luz UV.....	70
<b>Figura 10:</b> Indução de apoptose pela luz UV é inibida pela fotorreativação e pela inibição da síntese de DNA.....	72
<b>Figura 11:</b> Análise morfológica de apoptose em células CHO-9 e CHO-27.1.....	73
<b>Figura 12:</b> Ensaio de sobrevivência monoclonal após tratamento com MNNG em células de glioma.....	74
<b>Figura 13:</b> Análise da população sub-G1 após tratamento com MNNG em células de glioma.....	75
<b>Figura 14:</b> Histogramas representativos da cinética de indução de apoptose por 0,1 mM de TMZ em células U87MG (p53wt) e U138MG(p53mt).....	76
<b>Figura 15:</b> Estabilização de p53 após tratamento com TMZ em células U87MG (p53wt).....	77
<b>Figura 16:</b> Efeito de Pifithrin- $\alpha$ na indução de apoptose por MNNG e TMZ em células de glioma.....	78
<b>Figura 17:</b> Inibição da replicação em células de glioma tratadas com TMZ.....	79
<b>Figura 18:</b> Efeito de TMZ na síntese de RNA em células de glioma.....	80
<b>Figura 19:</b> Análise da expressão do receptor FAS após tratamento com TMZ em células de glioma.....	81
<b>Figura 20:</b> Inibição de FAS após tratamento com TMZ em células de glioma.....	82
<b>Figura 21:</b> Atividade de caspases após tratamento com TMZ em células de glioma.....	82

<b>Figura 22:</b> Inibição de PARP após tratamento com TMZ em células de glioma.....	83
<b>Figura 23:</b> Ensaio de sobrevivência monoclonal após irradiação UV em células de glioma.....	84
<b>Figura 24:</b> Indução de apoptose por luz UV em células de glioma.....	86
<b>Figura 25:</b> Confirmação do perfil apoptótico pelo teste de TUNEL.....	87
<b>Figura 26:</b> Atividade de caspase-3 após irradiação UV em células de glioma.....	88
<b>Figura 27:</b> <i>p53</i> inibe apoptose induzida por luz UV em células de glioma.....	90
<b>Figura 28:</b> Efeito da transfecção de <i>p53</i> em células U138MG ( <i>p53wt</i> ).....	91
<b>Figura 29:</b> Análise da estabilização de <i>p53</i> nuclear após irradiação UV.....	92
<b>Figura 30:</b> Influência de <i>p53</i> na via NER.....	93
<b>Figura 31:</b> Efeito da irradiação UV nas sínteses de DNA e RNA em células de glioma.....	94
<b>Figura 32:</b> Inibição da replicação em células de glioma irradiadas com luz UV.....	95
<b>Figura 33:</b> Inibição do receptor FAS em células de glioma irradiadas com luz UV.....	96
<b>Figura 34:</b> Análise da expressão protéica de Bcl-2, Bax e Bak após irradiação UV.....	97
<b>Figura 35:</b> Tratamento de células de glioma com cisplatina.....	99
<b>Figura 36:</b> Ensaio de sobrevivência monoclonal após tratamento de células de glioma com agentes cloroetilantes.....	101
<b>Figura 37:</b> Análise da cinética de formação de população sub-G1 em células de glioma após tratamento com agentes cloroetilantes.....	102
<b>Figura 38:</b> Análise da população sub-G1 após tratamento de células de glioma com diferentes concentrações de ACNU e BCNU.....	103
<b>Figura 39:</b> Análise de indução de apoptose e necrose por dupla marcação Anexina-V/PI após tratamento com ACNU e BCNU.....	105
<b>Figura 40:</b> Estabilização de <i>p53</i> após tratamento com ACNU.....	106
<b>Figura 41:</b> Inibição de <i>p53</i> aumenta sensibilidade de células de glioma ao tratamento com ACNU e BCNU.....	107
<b>Figura 42:</b> Influência de <i>MGMT</i> na apoptose induzida por ACNU em células de glioma.....	108
<b>Figura 43:</b> Inibição da síntese de DNA após tratamento com ACNU em células de glioma.....	110

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

