

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

TESE DE DOUTORADO

INFLUÊNCIA DO REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS NA
CITOTOXICIDADE DO ANTINEOPLÁSICO MITOXANTRONA

Jaqueline Cesar Rocha

Porto Alegre, janeiro de 2016.

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

INFLUÊNCIA DO REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS NA
CITOTOXICIDADE DO ANTINEOPLÁSICO MITOXANTRONA

Jaqueline Cesar Rocha

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular desta universidade, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Jenifer Saffi

Porto Alegre, janeiro de 2016.

*Dedico esta tese ao meu marido
Elton e ao meu filho João Vitor,
pelo apoio e amor em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Jenifer Saffi, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo. Agradeço por todo o apoio, confiança e principalmente, pelo carinho e amizade. Por acreditar em mim e incentivar o meu desenvolvimento, mesmo sabendo que não seria tão fácil.

As minhas queridas ex-alunas de iniciação científica Franciele F. Busatto e Lisiane K. de Souza, pela imensa ajuda durante o desenvolvimento do projeto e pela grande amizade que compartilhamos hoje. E não poderia deixar de lado a Victória Viero, minha IC emprestada em alguns momentos pela Fran... Sem vocês, esta tese não teria acontecido.

A grande “família” do “Lab 29” ou Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA): desde o início, quando éramos poucos, até agora, que somos muitos (mesmo considerando os ex-colegas nesta lista)... Ângelo, “Brunas”, “Paulas”, Fabiana, Renata, “Natálias”, Leopoldo, Roberto, Rodrigo, Helen, Jeferson, Luiza, Ana Moira, Betânia, Helena, Marcele, Jessica, Marina,... Obrigada pela ajuda e/ou pelos momentos divertidos que proporcionaram... Cassiana, Paula Manini e Verônica: obrigada pelas palavras de carinho e apoio durante os momentos mais difíceis... E a grande amiga Dinara Moura, por todo o apoio e incentivo.

A Cristina Winter, por toda a ajuda com nossos materiais, compras e todo o restante da parte burocrática do laboratório, sem falar nas boas conversas que tivemos sempre.

Aos colegas do Lab. 210 da Biofísica da UFRGS, pelas dúvidas esclarecidas ou simplesmente pelas conversas agradáveis: Victória, Cristiano, Michele, Diana, Miriana, Grettel...

Um agradecimento especial a grande colega Larissa Milano, pelas ajudas com nossas difíceis “filhas XP”... E também a Nuscha, pela grande ajuda na discussão e finalização dos artigos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste projeto.

A todos os amigos e familiares que sempre me incentivaram de alguma forma, mesmo com a minha ausência.

Um agradecimento mais que especial ao meu marido Elton, por todo amor, carinho e incentivo em tempo integral, e principalmente, por aguentar meu mau humor... Obrigada pelos inúmeros: “vai passar”, “vai dar tudo certo” e “se diverte com a vida, Jaqueline!”. E principalmente ao meu querido filho João Vitor, por também aguentar meus momentos sem paciência ou de mau humor... E pela falta de atenção em alguns momentos... Eu amo muito vocês dois!

Por fim, agradeço a Deus pela minha vida, por todas as oportunidades que tive e por me mostrar que tudo na vida acontece no momento certo.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta tese foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e algumas metodologias foram desenvolvidas no Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil - Projeto No. 12/1926-9), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil – Projeto No. 479564/2013-2), PRONEX - FAPERGS/CNPq (Projeto No. 10/0044-3) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brasil).

ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho está dividido da seguinte forma: Introdução, Objetivos (gerais e específicos), dois capítulos escritos na forma de artigo científico contendo uma página de apresentação sobre o assunto, Discussão Geral, Conclusões, Perspectivas, Referências e Anexo.

A Introdução contempla uma breve descrição do câncer e as principais drogas utilizadas como estratégia de tratamento, entre as quais se enquadram as drogas inibidoras das topoisomerasas. A seguir são descritos o papel destas enzimas, bem como as principais drogas desta classe, dando ênfase aos inibidores da topoisomerase II e em especial a mitoxantrona, objeto de estudo desta tese. Dando sequência, a introdução descreve os mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos, dando especial atenção aos mecanismos de reparo de danos ao DNA. É feita então a descrição destes mecanismos, com uma descrição detalhada do mecanismo da via de reparo por excisão de nucleotídeos (também objeto de estudo desta tese). Por fim, a introdução destaca os principais mecanismos de reparo de danos ao DNA envolvidos na resposta ao tratamento com inibidores da topoisomerase II.

O Capítulo I consiste de um artigo de dados, no qual foi investigado o papel da via de reparo por excisão de nucleotídeos na resposta a mitoxantrona. Este artigo deu origem a um manuscrito, aceito para publicação na revista *DNA Repair*.

O Capítulo II apresenta um artigo de revisão no qual são descritos os mecanismos de reparo de danos ao DNA envolvidos na resposta as drogas inibidoras da topoisomerase II, com ênfase no papel da via de reparo por excisão de nucleotídeos na remoção das lesões induzidas por estas drogas. Este artigo foi aceito para publicação na revista *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*.

A Discussão Geral contempla os comentários sobre os resultados apresentados nos Capítulos I e II, além de ressaltar a importância deste estudo. Por fim, são descritas as Conclusões e Perspectivas geradas por este trabalho, além das Referências utilizadas na elaboração desta tese e o Anexo.

RESUMO

A mitoxantrona (MXT) é um antineoplásico utilizado no tratamento de tumores como leucemias, linfoma não-Hodgkin e câncer de mama e próstata. Ela é classificada como uma antracenediona, sendo um análogo estrutural das antraciclinas, como a doxorubicina (DOX), cujo mecanismo de ação é baseado na inibição da enzima topoisomerase II (Topo II), através da formação dos complexos estabilizados Topo II-DNA. As antraciclinas e a MXT também são capazes de formar lesões do tipo adutos, pontes intercadeias de DNA (interstrand crosslink – ICL) e espécies reativas de oxigênio (ERO). Estudos têm demonstrado que a via de reparo por excisão de nucleotídeos (Nucleotide Excision Repair – NER) está envolvido na remoção de lesões no DNA induzidas pela DOX. Considerando as similaridades estruturais e de mecanismo de ação entre a MXT e a DOX, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da via NER na citotoxicidade da MXT, a fim de elucidar possíveis mecanismos envolvidos na resistência tumoral a esta droga. Os resultados encontrados demonstraram que células deficientes na via NER (XPA, XPD, XPC e CSB) apresentam elevada sensibilidade a MXT comparadas a células proficientes em reparo (MRC5). Apesar disso, células CSB (deficientes na subvia associada à transcrição - Transcription coupled – TCR-NER) são mais sensíveis a MXT que células XPC (deficientes na subvia de reparo global do genoma – Global genome repair – GGR-NER) e também apresentam diferenças no perfil de ciclo celular, síntese de DNA e formação dos complexos Topo II-DNA após tratamento com MXT. Células XPC, da mesma forma que as células proficientes MRC5 apresentam parada de ciclo celular em G2/M, recuperação da síntese de DNA e sinal semelhante para formação dos complexos Topo II-DNA, enquanto células CSB apresentam acúmulo de células na fase S, diminuição na síntese de DNA e sinal mais intenso para formação dos complexos Topo II-DNA. Além disso, a complementação das células CSB com a proteína CSB recuperou a resistência das células a MXT e também diminuiu a intensidade do sinal dos complexos Topo II-DNA. Estes resultados indicaram que a via NER está envolvida na resistência das células ao tratamento com MXT e que a proteína CSB ou a subvia TCR-NER tem um papel chave no processamento dos complexos Topo II-DNA. Palavras-chave: Mitoxantrona, NER, complexos Topo II-DNA, CSB, XPC

ABSTRACT

Mitoxantrone (MXT) is an antineoplastic drug used in treatment of tumors like leukemia, non-Hodgkin lymphoma and breast and prostate cancer. It is classified as an anthracenedione, being a structural analogue of anthracyclines, like doxorubicin (DOX), which action mechanism is based on topoisomerase II (Topo II) inhibition and formation of stabilized Topo II-DNA complexes. Anthracyclines and MXT also can form lesions like DNA adducts, interstrand crosslinks (ICL) and reactive oxygen species (ROS). Studies have shown that nucleotide excision repair (NER) pathway is involved in removal of lesions induced by DOX. Due to structural and action mechanism similarities between MXT and DOX, the aim of this work was to evaluate the influence of NER pathway in cytotoxicity of MXT, in order to elucidate possible mechanisms involved in tumor resistance to this drug. The results demonstrated that NER-deficient cells (XPA, XPD, XPC and CSB) show high sensitivity to MXT compared to repair proficient cells (MRC5). However, CSB cells (deficient in Transcription coupled repair – TCR) were more sensitive to MXT than XPC cells (deficient in Global genome repair – GGR) and also showed differences in cell cycle, DNA synthesis and Topo II-DNA complexes formation upon MXT treatment. XPC cells, in the same way as MRC5 proficient cells present G2/M cell cycle arrest, DNA synthesis recovery and similar signal for Topo II-DNA complexes formation, while CSB cells present accumulation of cells in S phase, reduced DNA synthesis and a more intense signal for Topo II-DNA complexes formation. Moreover, CSB cells complementation recovery MXT-resistance and also diminished Topo II-DNA complexes signal intensity. These results indicate that NER pathway is involved in cells resistance to MXT treatment and that CSB protein or TCR-NER sub pathway has a key role in processing of MXT induced Topo II-DNA complexes.

Keywords: Mitoxantrone, NER, Topo II-DNA complexes, CSB, XPC

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4-PPs – 6-4 fotoprodutos (*6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproducts*).

AMSA – Amsacrina.

ATM – Proteína mutada na Ataxia telangiectasia (*Ataxia telangiectasia mutated*).

ATP – Adenosina trifosfato.

ATR – Proteína relacionada à Ataxia telangiectasia e RAD3 (*ATM and RAD3-related*).

BER – reparo por excisão de bases (*base excision repair*).

CPDs – dímeros de pirimidina (*cyclobutane-pyrimidine dimers*).

CPT – Camptotecina.

CS – Síndrome de Cockayne (*Cockayne syndrome*).

CSA – Síndrome de Cockayne grupo A (*Cockayne Syndrome complementation group A*).

CSB – Síndrome de Cockayne grupo B (*Cockayne Syndrome complementation group B*).

DDR – Resposta a danos ao DNA (*DNA damage response*).

DMD – Droga modificadora da doença (*disease modifying drug*).

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*).

DNA pol – DNA polimerase.

DNA-PKcs – Proteína cinase dependente de DNA (*DNA-dependent protein kinase*).

DNR – Daunorrubicina (*daunorubicin*).

DOX – Doxorrubicina (*doxorubicin*).

DSB – Quebra de cadeia dupla de DNA (*double strand break*).

EPI – Epirubicina (*epirubicin*).

ERCC1 – Proteína de reparo por excisão 1 (*Excision repair cross-complementing group 1*).

ERO – Espécies reativas de oxigênio (*ROS – reactive oxygen species*).

ETO – Etoposido.

FA – Anemia de Fanconi (*Fanconi anemia*).

GGR – Reparo global do genoma (*global genome repair*).

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio.

HMGN1 – Proteína do domínio de ligação ao nucleossomo do grupo de alta mobilidade 1 (*High mobility group nucleosome binding domain 1*).

HR – reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination*).

ICL – Ponte intercadeias de DNA (*interstrand crosslink*).

IDA – Idarrubicina (*idarubicin*).

INCA – Instituto Nacional de Câncer.

MGMT – O⁶-metilguanina metiltransferase.

MMR – reparo de erros de emparelhamento (*mismatch repair*).

MMS – Metilmetanosulfonato.

MXT – Mitoxantrona (*mitoxantrone*).

NER – Reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*).

NHEJ – Junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*).

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*).

PI-3K – Fosfatidilinositol-3 cinases (*Phosphatidylinositol-3-kinases*).

RFC – Fator de replicação C (*Replication Factor C*).

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*).

RNA pol – RNA polimerase.

RPA – Proteína de replicação A (*replication protein A*).

Sítio AP – sítio apurínicos/apirimidínicos.

SSB – Quebra de cadeia simples de DNA (*single strand break*).

TARDIS – *Trapped in agarose DNA immunostaining*.

TCR – Reparo associado à transcrição (*transcription coupled repair*).

TDP1 – *Tyrosyl DNA-phosphodiesterase 1*.

TDP2 – *Tyrosyl DNA-phosphodiesterase 2*.

TFIIH – Fator de transcrição II-H (*Transcription factor II-H*).

TFIIS – Fator de transcrição II-S (*Transcription factor II-S*).

TLS – Síntese translesão (*Translesion synthesis*).

Topo I – Topoisomerase I.

Topo II – Topoisomerase II.

TTD – Tricotiodistrofia.

TTRAP – *TRAF and TNF receptor associated protein*.

UDS – Síntese de DNA não programada (*unscheduled DNA synthesis*).

UV – Radiação ultravioleta.

UV-DDB – Proteína de ligação ao DNA danificado por UV (*UV-damaged-DNA-binding protein*).

XAB2 – Proteína de ligação a XPA 2 (*XPA binding protein 2*).

XP – Xeroderma pigmentoso (*Xeroderma pigmentosum*).

XPA – Xeroderma pigmentoso grupo A (*Xeroderma pigmentosum complementation group A*).

XPB – Xeroderma pigmentoso grupo B (*Xeroderma pigmentosum complementation group B*).

XPC – Xeroderma pigmentoso grupo C (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*).

XPD – Xeroderma pigmentoso grupo D (*Xeroderma pigmentosum complementation group D*).

XPE – Xeroderma pigmentoso grupo E (*Xeroderma pigmentosum complementation group E*).

XPF – Xeroderma pigmentoso grupo F (*Xeroderma pigmentosum complementation group F*).

XPG – Xeroderma pigmentoso grupo G (*Xeroderma pigmentosum complementation group G*).

XPV – Xeroderma pigmentoso grupo V (*Xeroderma pigmentosum complementation group V*).

γ H2AX – Histona H2AX fosforilada.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Introdução

Figura 1. Mecanismo de ação das topoisomerases.....	21
Figura 2. Representação esquemática do ciclo da topoisomerase II e a ação dos inibidores nas diferentes etapas.....	23
Figura 3. Estruturas da doxorubicina (DOX), daunorrubicina (DNR), epirrubicina (EPI) e idarrubicina (IDA).....	25
Figura 4. Estrutura da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos.....	27
Figura 5. Estrutura da mitoxantrona.....	28
Figura 6. Mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos.....	32
Figura 7. Principais vias de reparo de danos ao DNA envolvidas na resposta aos quimioterápicos.....	35
Figura 8. Representação esquemática da via NER.....	39
Figura 9. Representação esquemática de uma das vias de reparo de pontes intercadeias (ICL – <i>Interstrand crosslink</i>).....	44
Figura 10. Representação esquemática do reparo de complexos Topo II-DNA.....	49

Capítulo I

Figure 1. NER-deficient cells have higher sensitivity to MXT.....	67
Figure 2. MXT induces DNA damage in a dose-dependent manner.....	69
Figure 3. NER-deficient cells have a different cell cycle and DNA synthesis profiles.....	70
Figure 4. NER proficient and deficient cells present no ROS formation after MXT treatment.....	72

Figure 5. CSB cells have a more intense signal for Topo II-DNA complexes formation.....	74
Figure 6. Complementation with CSB protein protects against the effects of MXT in CSB-deficient cells.....	75
Figure 7. Proposed model for participation of NER proteins in response to DNA damage induced by MXT.....	80

Capítulo II

Figure 1: Different action mechanisms of topoisomerase I and II in the formation of DNA cleavage complexes.....	93
Figure 2: Topoisomerase inhibitors structure.....	101
Figure 3: Representation of possible lesions induced by Topo II inhibitors type poisons.....	102
Figure 4: Proposed mechanism for NER interaction with Topo II inhibitors.....	118
Table 1: Topo II inhibitors type poisons and their relation with DNA repair pathways involved in the removal of drug-induced lesions.....	117

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1 Câncer.....	18
1.2 Principais drogas utilizadas no tratamento do câncer.....	19
1.3 Inibidores das topoisomerases.....	20
1.3.1 Inibidores da topoisomerase I.....	22
1.3.2 Inibidores da topoisomerase II.....	23
1.3.2.1 Antraciclinas.....	24
1.3.2.2 Epipodofilotoxinas.....	27
1.3.2.3 Mitoxantrona.....	28
1.3.2.4 Tumores relacionados à terapia com inibidores da topoisomerase II.....	30
1.4 Mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos.....	31
1.5 Vias de reparo de danos ao DNA.....	34
1.5.1 Reparo direto.....	35
1.5.2 Reparo por excisão de bases.....	35
1.5.3 Reparo de quebras duplas.....	36
1.5.4 Reparo de erros de emparelhamento.....	37
1.5.5 Reparo por excisão de nucleotídeos.....	38
1.5.5.1 Reconhecimento das lesões – TCR.....	40
1.5.5.2 Reconhecimento das lesões – GGR.....	41
1.5.5.3 Verificação da lesão e montagem do complexo pré-incisão.....	42
1.5.5.4 Excisão do dano, síntese de reparo e ligação das cadeias.....	42
1.5.5.5 NER e reparo de ICL.....	43
1.5.5.6 NER e reparo de lesões oxidativas.....	45
1.5.5.7 NER e a resposta aos quimioterápicos.....	46
1.6 Reparo de lesões induzidas por inibidores da topoisomerase II.....	47
2. Objetivos.....	54
2.1 Objetivo Geral.....	54

2.2 Objetivos Específicos.....	54
3. Capítulo I.....	55
4. Capítulo II.....	87
5. Discussão Geral.....	132
6. Conclusões.....	141
6.1 Conclusão Geral.....	141
6.2 Conclusões Específicas.....	141
7. Perspectivas.....	143
8. Referências.....	144
Anexo I – Carta do editor da revista <i>DNA Repair</i> , confirmando o aceite para publicação do artigo “Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity”.....	159
Anexo II – Carta do editor da revista <i>Mutation Research – Reviews in Mutation Research</i> , confirmando o aceite para publicação do artigo “Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA damage induced by Topoisomerase II Inhibitors”.....	160
Anexo III – <i>Curriculum vitae</i>	161

1. Introdução

1.1 Câncer

Nos últimos anos, o câncer tem emergido como um dos grandes problemas de saúde pública mundial, com aumento significativo no número de pessoas afetadas. Mesmo com os grandes avanços que foram conseguidos em termos de tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes, a doença ainda apresenta elevados índices de morbidade e mortalidade. Desta forma, um dos grandes desafios da ciência, atualmente, continua sendo a busca por novas estratégias de tratamentos e pela cura do câncer.

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem se dá por condições multifatoriais, sendo que esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese) [INCA, 2015]. Apesar de o processo de desenvolvimento do câncer ter sido reconhecido há séculos, pouco se sabia sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão do tumor até o advento da medicina molecular na segunda metade do século XX. Inicialmente, as estratégias de tratamento eram baseadas principalmente na cirurgia, sendo que o início da terapia com uso de radiação ocorreu somente por volta de 1960, porém, sua efetividade era limitada a tumores localizados [revisado por Chabner & Roberts Jr., 2005]. Os primeiros registros do uso de drogas no tratamento de tumores iniciaram nos anos 40, com o uso de mostardas nitrogenadas no tratamento de linfomas não-Hodgking e leucemias, bem como os primeiros estudos sobre o efeito do ácido fólico e análogos no tratamento de leucemias. Apesar de estes estudos iniciais terem tido remissão dos tumores por curtos períodos, demonstraram o princípio de que a administração de drogas via sistêmica poderia levar a regressão dos tumores, sendo marcos para o início da quimioterapia moderna [revisado por Chabner e Roberts Jr., 2005; Cheung-Ong et al., 2013].

1.2 Principais drogas utilizadas no tratamento do câncer

As estratégias de tratamento do câncer são usualmente fundamentadas na exposição do corpo a agentes que matam as células tumorais de modo mais eficiente que as células de tecidos normais, explorando desta forma, características celulares e moleculares dos tumores que devem ser eliminados. Considerando que a maioria das células tumorais prolifera mais rápido que células normais, o ciclo celular é um dos principais alvos destas drogas, podendo ser afetado diretamente, através de inibidores do fuso mitótico (prevenindo desta forma a igual divisão das células), por exemplo; ou alterando sinais de crescimento que fazem com que as células entrem em divisão, através do uso de manipulação hormonal ou anticorpos terapêuticos e drogas que inibem vias sinalizadoras de crescimento [Helleday et al., 2008]. Entretanto, uma das principais estratégias no tratamento do câncer está em utilizar agentes que danificam o DNA das células, visto que a integridade do DNA é crítica para que se tenha um adequado funcionamento e proliferação celular. O conceito de uso do DNA como alvo para drogas anticâncer inspirou o desenvolvimento de diversas classes de compostos, que apresentam grande importância na clínica, entre as quais podemos citar alguns exemplos como os antimetabólitos, os agentes alquilantes e as drogas inibidoras das topoisomerases [Cheung-Ong et al., 2013].

Os antimetabólitos são moléculas que se assemelham a nucleotídeos (análogos) ou a precursores ou cofatores requeridos para a síntese dos nucleotídeos, alterando desta forma o metabolismo do DNA e RNA. Os análogos de nucleotídeos exercem seus efeitos citotóxicos após incorporação no DNA pelas DNA polimerases, uma vez que a incorporação de nucleotídeos “fraudulentos” ocasiona um impedimento estérico e posterior colapso das forquilhas de replicação. Como a incorporação no DNA é crítica para suas toxicidades, estes agentes apresentam especificidade para células com síntese ativa em vias de replicação ou em vias de reparo por excisão. Como representantes desta classe podem ser citados os análogos de pirimidinas, como o 5-fluorouracil, a citarabina e a gencitabina; e os análogos de purinas, como a 6-mercaptopurina, a fludarabina e a cladribina. O 5-fluorouracil e a fludarabina, ao contrário dos outros, ainda tem a capacidade de serem incorporados no RNA, impedindo a transcrição [revisado por Ewald et al., 2008]. Já os antifolatos antagonizam os efeitos do ácido fólico, cofator essencial para a síntese dos nucleotídeos. O metotrexato e o pemetrexede

atuam através da inibição da dihidrofolato redutase, enquanto o raltitrexato, também inibe diretamente a enzima timidilato sintase. A inibição destas enzimas, por sua vez, leva a uma diminuição na síntese de timina ou das purinas e a depleção dos estoques de nucleotídeos, afetando a síntese de DNA e RNA, e por fim ocasionando a morte celular [revisado por Chabner e Roberts Jr., 2005].

Após a descoberta de que as mostardas nitrogenadas inicialmente estudadas por Goodman e Gilman agiam diretamente sobre o DNA, diversos outros compostos com capacidade de reagir quimicamente com o DNA foram desenvolvidos. Estes compostos, chamados agentes alquilantes, podem modificar as bases do DNA diretamente, se intercalar entre os pares de bases ou formar ligações cruzadas (*crosslinks*) com o DNA [revisado por Cheung-Ong et al., 2013]. Os agentes alquilantes podem ser divididos em duas classes: monofuncionais, que reagem com apenas uma cadeia de DNA modificando apenas uma simples base; e bifuncionais, que tem dois sítios reativos e fazem ligações cruzadas entre o DNA e proteínas ou alternativamente, ligar duas bases do DNA na mesma cadeia formando uma ponte intracadeia (*Intra-strand crosslink*) ou em cadeias opostas formando uma ponte intercadeias (*Interstrand crosslink - ICL*) [revisado por Helleday et al., 2008]. Como exemplos desta classe de drogas estão derivados das mostardas nitrogenadas, como a ciclofosfamida, o clorambucil e o melfalano. Outros exemplos incluem as nitrosouréias, como a carmustina, e os triazenos, como a dacarbazina e a temozolamida. Alguns produtos naturais como a mitomicina C também tem a capacidade de alquilar o DNA. Os agentes alquilantes platinados são drogas amplamente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer. A cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina são representantes deste tipo de agente alquilante [revisado por Cheung-Ong et al., 2013].

1.3 Inibidores das topoisomerases

As topoisomerases são enzimas que desempenham papel essencial em processos fundamentais da molécula de DNA, como replicação, transcrição e segregação dos cromossomos, removendo supertorções e emaranhados da molécula de DNA. O genoma humano codifica seis topoisomerases, que são classificadas em tipo I e tipo II. Enzimas do tipo I clivam uma fita do DNA, gerando uma quebra simples na dupla fita do DNA,

através da qual ocorre a passagem da outra fita, enquanto as do tipo II quebram as duas fitas, originando uma quebra dupla na molécula do DNA, permitindo a passagem da outra cadeia através desta quebra. Estas clivagens e passagens de cadeias através das quebras impedem a supertorção e relaxam a molécula de DNA, favorecendo os processos celulares [revisado por Pommier et al., 2010].

Uma característica comum entre as topoisomerases é seu mecanismo catalítico, o qual em todos os casos consiste de um ataque nucleofílico a uma ligação fosfodiéster do DNA por um resíduo catalítico tirosil da topoisomerase. As enzimas do tipo I funcionam como monômeros e não necessitam de cofatores de alta energia. Por outro lado, as enzimas do tipo II funcionam como homo dímeros e necessitam íons metálicos divalentes e ATP para completarem seu ciclo catalítico. As topoisomerases clivam e religam o DNA através da formação de um intermediário entre o seu resíduo catalítico tirosil e a extremidade da cadeia de DNA quebrada. As topoisomerases do tipo IB formam este intermediário na extremidade 3' da quebra, por outro lado, as do tipo IA e IIA se ligam as extremidades 5' da quebra no DNA (figura 1). Esses intermediários são geralmente referidos como complexos cliváveis [revisado por Pommier et al., 2006; Dewese & Osheroff, 2009].

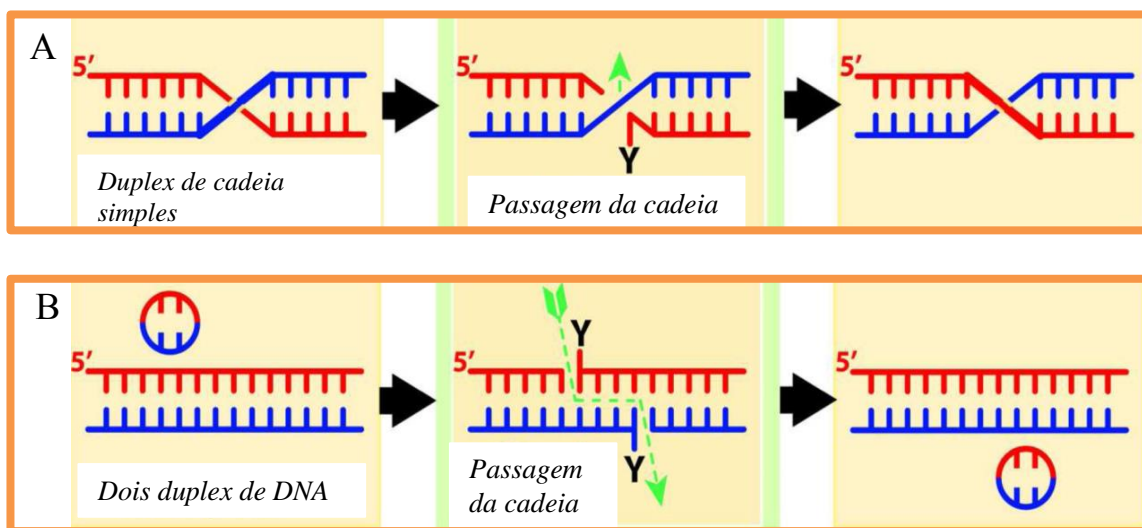


Figura 1. Mecanismo de ação das topoisomerases. (A) Topoisomerases tipo IA clivam uma cadeia simples do DNA e permitem a passagem da outra cadeia simples através da quebra. (B) Topoisomerases tipo II clivam as duas fitas do duplex de DNA e permitem a passagem de outro duplex através da quebra. Adaptado de Pommier, 2013.

Devido ao papel fundamental destas enzimas para os processos celulares, as drogas que inibem as topoisomerases têm grande importância na clínica. Os inibidores das topoisomerases são extremamente seletivos e tidos como terapias alvo-específico. Inibidores da topoisomerase I (Topo I) clinicamente relevantes não afetam a topoisomerase II (Topo II) e inversamente, inibidores da Topo II não afetam a Topo I. Além disso, inibidores das topoisomerases bacterianas são inativos contra as topoisomerases do hospedeiro [revisado por Pommier, 2013].

1.3.1 Inibidores da topoisomerase I

O precursor dos inibidores da Topo I foi a camptotecina (CPT), um alcalóide isolado da planta *Camptotheca acuminata*, no ano de 1966. A descoberta do seu mecanismo de ação ocorreu somente 20 anos após sua descoberta, onde foi demonstrado que o alvo da CPT era a Topo I, através do envenenamento dos complexos cliváveis (também chamados complexos Topo I-DNA), inibindo de maneira irreversível a religação da quebra na fita do DNA. A partir da descoberta da sua potente atividade, foram desenvolvidos derivados da CPT solúveis em água, os quais são utilizados atualmente na clínica [revisado por Pommier et al., 2010]. O topotecano é prescrito rotineiramente para câncer de ovário e de pulmão de pequenas células, enquanto o irinotecano é principalmente utilizado para tratamento de tumores gastrointestinais (colo retal e gastresofágico). Topotecano e irinotecano ainda são utilizados para tratamento de tumores do sistema nervoso central, sarcomas e câncer cervical [Micromedex, 2015].

Apesar da sua efetividade, os derivados da CPT possuem algumas limitações. Uma delas é a sua rápida e espontânea inativação em pH fisiológico, pela abertura do anel lactona formando um derivado carboxilato, que é rapidamente depletado da corrente sanguínea pela ligação a albumina do sangue. Outro problema é que a reversão dos complexos Topo I-DNA ocorre rapidamente após a remoção da droga, de forma que são necessárias longas infusões nos pacientes para que se obtenha o efeito desejado. Por estes motivos, atualmente estão sendo desenvolvidos derivados a fim de superar essas limitações [revisado por Pommier, 2009].

1.3.2 Inibidores da topoisomerase II

As células de mamíferos codificam duas isoformas da topoisomerase II: Topo II α e β . A Topo II α é essencial para sobrevivência de células que estão em crescimento, com os níveis da enzima aumentando significativamente durante a proliferação celular e com pico de concentração em G2/M, enquanto a isoforma β é independente do estado proliferativo da célula [revisado por McLendon & Osheroff, 2007].

As drogas inibidoras da Topo II são divididas em duas classes: os inibidores catalíticos da Topo II, que matam as células através da eliminação da atividade enzimática essencial da Topo II; e os venenos da Topo II (*Topo II poisons*), que atuam através do aumento dos níveis dos complexos cliváveis (complexos Topo II-DNA) e também geram lesões que incluem quebras de cadeias e proteínas ligadas covalentemente ao DNA (figura 2) [revisado por Nitiss, 2009]. Inibidores e venenos são geralmente antagonistas e podem ser distinguidos com base em critérios de citotoxicidade: altos níveis de Topo II fazem com que as células sejam hipersensíveis aos venenos, mas resistentes aos inibidores, enquanto níveis diminuídos da enzima tornam as células resistentes aos venenos e hipersensíveis aos inibidores [Montecucco & Biamonti, 2007].

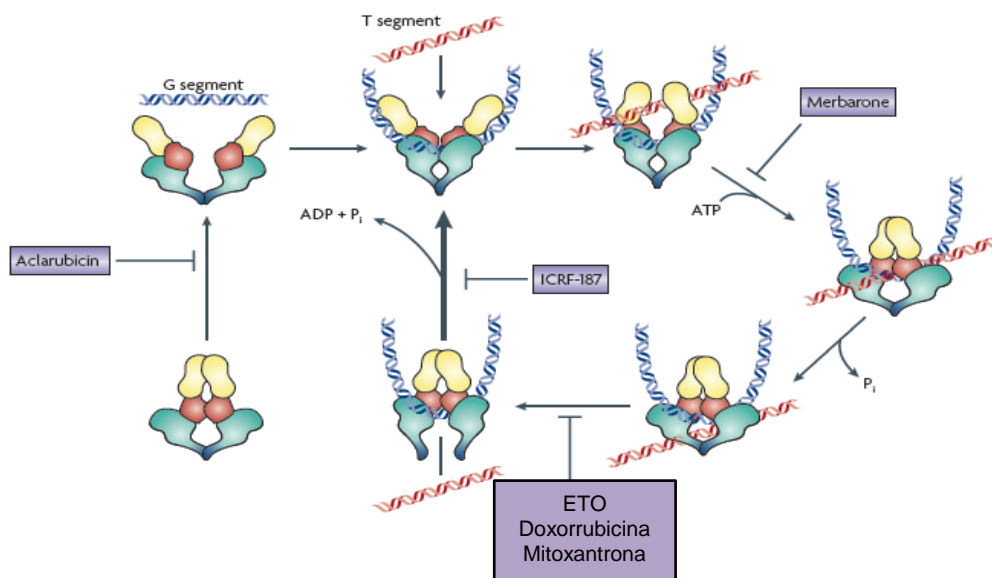


Figura 2. Representação esquemática do ciclo da topoisomerase II e a ação dos inibidores nas diferentes etapas do ciclo. Os inibidores do tipo *poisons*, como ETO, doxorubicina e mitoxantrona atuam após a

etapa de passagem da dupla fita através da quebra (impedindo a religação da mesma), através da formação dos complexos estabilizados droga-Topo II-DNA. Adaptado de Nitiss, 2009.

A geração de altos níveis dos complexos Topo II-DNA tem grandes efeitos na fisiologia celular, bloqueando efetivamente a replicação e a transcrição, sendo que o processamento destes complexos leva a formação de quebras de cadeia do DNA e a subsequente morte celular. Os venenos incluem a maioria dos agentes clinicamente ativos, incluindo a doxorubicina, o ETO e a mitoxantrona [revisado por Nitiss, 2009].

1.3.2.1 Antraciclinas

As antraciclinas são classificadas como uma das mais efetivas classes de drogas anticâncer já desenvolvidas. A principal representante desta classe é a doxorubicina (DOX), que foi isolada da bactéria *Streptomyces peucetius* nos anos de 1960, tão logo após a descoberta da daunorrubicina (DNR) nos anos de 1950 [revisado por Minotti et al., 2004]. Enquanto a DNR é usada principalmente para tratamento de leucemias, a DOX é a droga de primeira linha no tratamento de câncer de mama, sendo também utilizado em sarcomas de ossos e tecidos moles, câncer de bexiga, da tireoide, linfomas, mieloma múltiplo, entre outros [Neto, 2013; Micromedex, 2015]. Derivados da DOX e DNR foram desenvolvidos com os objetivos de melhorar a atividade e a tolerabilidade destas drogas. A epirrubicina (EPI) é um derivado semissintético da DOX, que permitiu melhoras na farmacocinética e metabolismo, como um elevado volume de distribuição e uma eliminação mais rápida [revisado por Minotti et al., 2004]. A EPI é usada principalmente no tratamento de câncer de mama [Neto, 2013; Micromedex, 2015]. Já a idarrubicina (IDA) foi desenvolvida a partir da DNR, de modo que se obteve uma droga com melhor lipofilicidade e absorção. Assim como a DNR, a IDA é usada principalmente no tratamento de leucemias [Neto, 2013; Micromedex, 2015].

A farmacologia molecular e o mecanismo de ação das antraciclinas são complexos, exibindo algumas peculiaridades. Todas as antraciclinas consistem de um grupamento aglicona composto por um anel tetracíclico, ligado a um amino-açúcar, formando uma estrutura planar que possibilita a intercalação entre os pares de bases do DNA (figura 3) [Blasiak et al., 2002; Minotti et al., 2004]. Dessa forma, em adição a

formação dos complexos Topo II-DNA, as antraciclina ainda são potentes intercalantes do DNA, o que ocasiona que apesar da formação dos complexos Topo II-DNA ser obtida a partir de concentrações sub micromolar, a mesma diminui à medida que as concentrações das antraciclina aumentam, uma vez que é favorecida a sua intercalação no DNA. Apesar disso, a remoção dos complexos é lenta após a remoção da droga, explicando os potentes efeitos das antraciclina sobre a Topo II [revisado por Pommier et al., 2013].

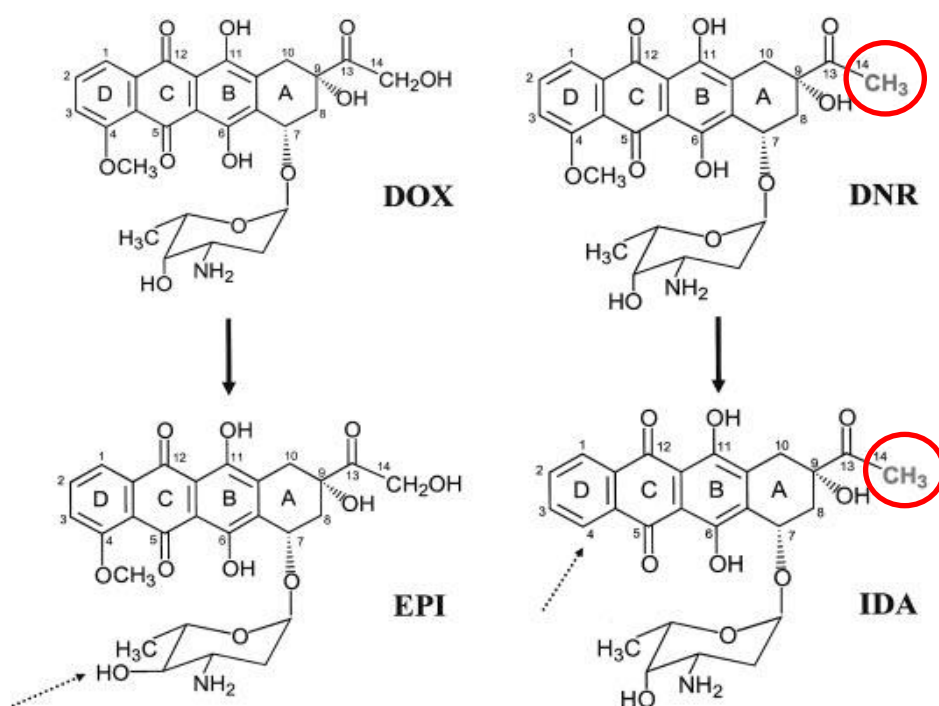


Figura 3. Estruturas da doxorubicina (DOX), daunorubicina (DNR), epirubicina (EPI) e idarubicina (IDA). A estrutura básica das antraciclina é formada por um anel tetracíclico ligado a um amino-açúcar. Circulado em vermelho a modificação para um grupo metila nas estruturas da DNR e IDA, em substituição ao grupo álcool na DOX e EPI. Na seta pontilhada, a epimerização do grupo hidroxila no carbono 4 do amino-açúcar na EPI em relação a DOX, ou a perda do grupo metóxi no carbono 4 do anel D da DNR em relação a IDA. Adaptado de Minotti et al., 2004.

As antraciclina podem sofrer a redução de um elétron e formar espécies reativas de oxigênio (ERO). Na presença de oxigênio e metais, o motivo quinona do anel C das antraciclina pode ser reduzido a um radical semiquinona, que rapidamente pode ser regenerado à custa da oxidação do oxigênio e gerar ERO como o radical superóxido e o

peróxido de hidrogênio, por fim gerando um radical hidroxil [Blasiak et al., 2002; Minotti et al., 2004]. As antraciclinas também têm a capacidade de formar adutos no DNA, que podem ser detectados em células em cultura a partir do tratamento simples com DOX em doses abaixo de 10nM [Coldwell et al., 2008]. A formação destes adutos é favorecida pela presença de formaldeído, que nas células pode ser derivado a partir de uma gama de fontes de carbono. Além disso, células tumorais exibem níveis mais elevados de formaldeído comparado a células normais, podendo favorecer a toxicidade seletiva da DOX, formando mais adutos em células tumorais [Cutts et al., 2005]. A formação de lesões do tipo ICL também é observada após tratamento de células tumorais com antraciclinas, sendo a citotoxicidade destes compostos fortemente correlacionada com a formação dos ICL [Skladanovski & Konopa, 1994].

A toxicidade das antraciclinas é resultante tanto dos danos causados diretamente por todos estes tipos de lesões, como também pelo processamento destes danos, que pode levar a formação de quebras simples (*Single Strand Breaks* - SSB) e duplas (*Double Strand Breaks* – DSB) de cadeia do DNA, induzindo a morte celular.

Apesar da sua grande efetividade, o uso das antraciclinas tem como um dos mais importantes efeitos colaterais a sua cardiotoxicidade, limitando a janela terapêutica destes compostos [Minotti et al., 2004]. Essa cardiotoxicidade é grande parte atribuída à formação de complexos ferro-antraciclinas que são propensos a sofrer reação redox, produzindo altos níveis de ERO e danificando estruturas subcelulares [Martin et al., 2009]. Entretanto, trabalhos recentes com a DOX têm demonstrado que essa cardiotoxicidade não é devido somente ao ciclo redox, podendo ser também dirigida pelo envenenamento específico da isoforma Topo II β pela DOX, com a ativação de vias de resposta ao dano no DNA e apoptose e desencadeando uma acentuada alteração no transcriptoma, que seletivamente afetaria a fosforilação oxidativa e a biogênese mitocondrial em cardiomiócitos [Zhang et al., 2012]. Além disso, o desequilíbrio no controle dos níveis intracelulares de cálcio pelo retículo sarcoplasmático causado pela DOX também pode colaborar para a toxicidade cardíaca [Chugun et al., 2008].

1.3.2.2 Epipodofilotoxinas

As epipodofilotoxinas são derivadas semissintéticas da podofilotoxina, um produto natural isolado da planta *Podophyllum peltatum*, entretanto, a sua grande toxicidade impossibilitou o uso na clínica, levando ao desenvolvimento de derivados com melhor atividade antineoplásica e menor toxicidade que são utilizados atualmente: o etoposido (ETO) e o teniposido (figura 4) [Baldwin & Osheroff, 2005]. O ETO é usado principalmente para tratamento de câncer de pulmão de pequenas células (combinado com outros agentes, como terapia de primeira linha) e câncer de testículo refratário [Micromedex, 2015], além de linfomas Hodgkin e não-Hodgkin, câncer de ovário, entre outros [Neto, 2013], enquanto o teniposido é usado principalmente para tratamento de câncer de pulmão de pequenas células (após falha da terapia de primeira linha), carcinoma de cérvix e de ovário metastático [Micromedex, 2015].

O ETO, diferente da antraciclinas, é um composto não intercalante, que apresenta fraca interação com o DNA na ausência da Topo II. Como não possui capacidade de intercalar no DNA, seu mecanismo de ação é baseado primariamente na inibição da habilidade da enzima religar a clivagem do DNA, estabilizando os complexos cliváveis Topo II-DNA [McLendon et al., 2007; Montecucco et al., 2007]. A estabilização do complexo se dá através da ligação de uma molécula de ETO a cada monômero da enzima, de modo que cada molécula estabiliza apenas uma quebra simples da cadeia do DNA, portanto, dependendo da razão molar entre o ETO e a Topo II, podem ser geradas SSB ou DSB, com a enzima ligada covalentemente a extremidade 5' através da ligação fosfotirosil [Bromberg et al., 2003].

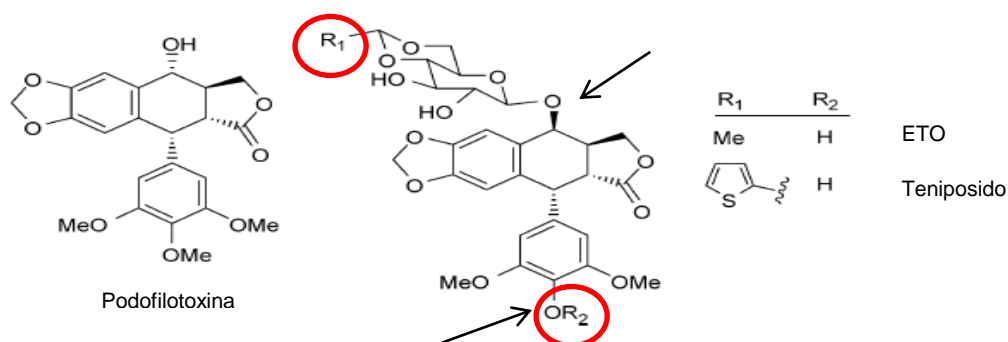


Figura 4. Estrutura da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. As setas representam as alterações na estrutura básica da podofilotoxina, com a retirada do grupamento metila do carbono 4' e a inserção de um motivo β-glicosídico no carbono 7. Nos círculos em vermelho são representados os locais onde foram inseridos os grupamentos substituintes. Adaptado de Gordaliza et al., 2004.

1.3.2.3 Mitoxantrona

A mitoxantrona (MXT) é um antineoplásico sintético que pertence à classe das antracenedionas. O composto inicial desta classe apresentava efeitos modulatórios sobre o sistema imune, sendo mais tarde demonstrada sua significativa atividade sobre tumores murinos [Au et al., 1981]. A MXT é um análogo estrutural das antraciclinas, que foi originalmente sintetizada com o objetivo de encontrar análogos com menor cardiotoxicidade, mas que mantivessem a potente citotoxicidade. Da estrutura original das antraciclinas foi retirado o açúcar daunosamina, o qual foi substituído por duas cadeias laterais amino-alquila idênticas. Foi mantido o anel policíclico planar aromático e desta forma, a capacidade de intercalar entre os pares de bases do DNA (figura 5) [Lown et al., 1984; Parker et al., 2000]. Entre diversos análogos, a MXT apresentou melhor atividade, inclusive quando comparada a DOX, sendo selecionada posteriormente para estudos clínicos devido a sua potência e excelente atividade antitumoral em camundongos [Au et al., 1981; White & Durr, 1985].

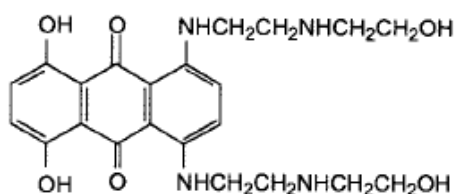


Figura 5. Estrutura da mitoxantrona. A mitoxantrona é um análogo estrutural das antraciclinas, das quais foram retirados o motivo amino-açúcar e o anel tetracíclico A, porém foi mantida a estrutura policíclica planar aromática que permite a sua intercalação entre os pares de bases do DNA. Adaptado de Minotti et al., 2004.

A MXT é utilizada para tratamento de leucemias, linfomas não-Hodgking, câncer de mama e de próstata [Micromedex, 2015; Neto, 2013]. Devido ao seu efeito imunossupressor, a MXT também é utilizada no tratamento de esclerose múltipla, como

uma droga modificadora da doença (DMD – *Disease Modifying Drug*), tendo impactos sobre a taxa de recaída, acúmulo de incapacidades e desfechos radiológicos [Fenu et al., 2015].

Os estudos iniciais demonstraram que a MXT inibia a síntese de DNA, RNA e proteínas, suprimia a proliferação celular e induzia aberrações nucleares e alterações estruturais em células tumorais, semelhante as que eram induzidas pela DOX [Safa & Tseng, 1984; White & Durr, 1985]. Pouco tempo depois, foi demonstrado que células resistentes as epipodofilotoxinas também apresentavam resistência cruzada com a MXT e a outras drogas como a DOX, e que isso possivelmente seria em função de possuírem um alvo comum [Glisson et al., 1986]. Neste mesmo ano foi descoberto que a MXT inibia a Topo II e que essa inibição ocorria somente *in vivo*, uma vez que a enzima purificada não era afetada pela droga [Crespi et al., 1986]. A elevada toxicidade da MXT era devido em parte à formação dos complexos Topo II-DNA, que apresentavam um estabilidade maior, permanecendo nas células por mais tempo quando comparado aos complexos formados pela amsacrina (AMSA), outro inibidor da Topo II [Fox & Smith, 1990].

Assim como a DOX, a MXT também tem a capacidade de formar adutos no DNA. Estudos *in vitro* demonstraram que esses adutos ocorrem preferencialmente em regiões 5'-CA e 5'-CG e tem a capacidade de bloquear a progressão da RNA polimerase [Panousis & Phillips, 1994]. A formação dos adutos é favorecida pela presença de formaldeído [Parker et al., 1999; Parker et al., 2000], o que é biologicamente relevante, uma vez que níveis mais elevados de formaldeído são encontrados células de tumores para os quais a MXT é bastante citotóxica, como leucemias [Thorndike & Beck, 1977]. O tratamento de células tumorais com MXT também induz lesões do tipo ICL, sendo a formação destas lesões dependente da metabolização da MXT pelas células, uma vez que não ocorre quando a droga é adicionada a sistemas livre de células, e estando fortemente relacionada com a elevada citotoxicidade da MXT [Skladanovski & Konopa, 2000].

A formação de ERO e indução de peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA também são observados após tratamento com MXT [Novak & Kharasch, 1985; Blasiak et al., 2002; Tarasiuk et al., 2005]. Entretanto, apesar da estrutura semelhante, a MXT

tem uma capacidade reduzida de entrar num ciclo redox fútil de formação dos radicais semiquinona, apresentando níveis mais baixos de formação de ERO comparado as antraciclinas [revisado por Costa et al., 2013].

Apesar do excelente efeito antitumoral, o uso da MXT também é limitado devido à cardiotoxicidade induzida pela droga, entretanto, os mecanismos envolvidos nesta cardiotoxicidade ainda não são totalmente compreendidos [revisado por Costa et al., 2013]. A toxicidade da MXT em células cardíacas é mais pronunciada após a sua metabolização [Rossato et al., 2013a], envolvendo diversas alterações celulares, como diminuição dos níveis intracelulares de ATP, inibição da expressão e atividade da ATP-sintase, alterações no potencial de membrana mitocondrial e elevação dos níveis intracelulares de cálcio, ocasionando um desequilíbrio energético [Rossato et al., 2013b]. O estresse oxidativo é descrito como um possível mecanismo envolvido na cardiotoxicidade da MXT, devido às semelhanças estruturais com as antraciclinas, entretanto, a formação de ERO não é observada em curtos períodos de tratamento em doses clinicamente relevantes [Rossato et al., 2013b]. Outro possível mecanismo envolvido é o desequilíbrio na regulação dos níveis intracelulares de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, no qual a MXT causa um efeito menos pronunciado que a DOX, o que poderia colaborar para a cardiotoxicidade reduzida da MXT comparada a DOX [Chugun et al., 2008].

1.3.2.4 Tumores relacionados à terapia com inibidores da Topo II

Embora apresentem grande efetividade no tratamento de diversos tipos de câncer, os inibidores da Topo II (assim como agentes alquilantes, antimetabólitos e radioterapia) podem ter como um importante e severo efeito adverso o desenvolvimento de tumores secundários relacionados à terapia [revisado por Allan & Travis, 2005]. Os inibidores da Topo II estão principalmente relacionados ao desenvolvimento de leucemias agudas, com números mais elevados atualmente, devido principalmente as maiores taxas de cura e tratamentos mais agressivos dos tumores primários, que podem ser tanto hematológicos como não hematológicos [revisado por Cowell & Austin, 2012]. O uso da MXT no tratamento da esclerose múltipla também é associado ao

desenvolvimento de leucemia, a qual na maioria dos casos tem bom prognóstico e remissão completa da doença após o tratamento [Capobianco et al., 2008].

A estabilização dos complexos Topo II-DNA devido à inibição da religação da clivagem pela Topo II resulta na formação de DSB, que têm potencial para participarem de translocações gênicas. Os rearranjos que ocorrem nos genes MLL (*mixed lineage leukemia*) e PML (*promyelocytic leukemia*) são os mais frequentemente associados aos tumores secundários relacionados a inibidores da Topo II, sendo geralmente usados como marcadores deste tipo de leucemias [revisado por Pendleton et al., 2014]. Estas translocações são resultantes principalmente do reparo das DSB pela via de junção de extremidades não homólogas (*Non Homologous End Joining* – NHEJ), sendo observadas pequenas inserções e deleções, bem como micro sequências homólogas entre os genes mais comumente afetados e seus genes associados [Mistry et al., 2005; revisado por Ashour et al., 2015].

Apesar de ambas as isoformas Topo II α e β contribuírem para os efeitos citotóxicos dos inibidores, estudos recentes têm sugerido que a isoforma β é primariamente responsável pela geração das DSB que iniciam as translocações gênicas observadas nas leucemias relacionadas à terapia [revisado por Cowell & Austin, 2012; Pendleton et al., 2014]. Além disto, em modelos animais, o desenvolvimento de melanomas secundários relacionados ao tratamento com inibidores da Topo II (ETO) também foi associado à inibição específica desta isoforma [Azarova et al., 2007]. Desta forma, assim como a cardiotoxicidade das antraciclinas também vem sendo associada à isoforma β , o desenvolvimento de inibidores específicos da isoforma α traria grandes benefícios para o tratamento com inibidores da Topo II, diminuindo os principais efeitos adversos severos relacionados a terapia com estas drogas.

1.4 Mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos

A quimioterapia é a principal estratégia no tratamento do câncer, porém, a sua efetividade pode ser limitada devido à resistência tumoral às drogas. Esta resistência pode ser dividida em dois tipos: intrínseca, a qual é mediada por fatores pré-existent no tumor, tornando a terapia ineficiente; ou adquirida, a qual se desenvolve durante o

tratamento de tumores inicialmente sensíveis, podendo ser causada por mutações surgidas durante o tratamento ou por várias outras respostas adaptativas, como expressão aumentada do alvo terapêutico ou ativação de vias sinalizadoras compensatórias [revisado por Holohan et al., 2013]. Entre os principais mecanismos que podem atuar na resistência tumoral podemos citar a inativação das drogas, alterações que ocorrem no efluxo ou no alvo da droga, modificações epigenéticas, inibição da morte celular e reparo dos danos ao DNA (figura 6).

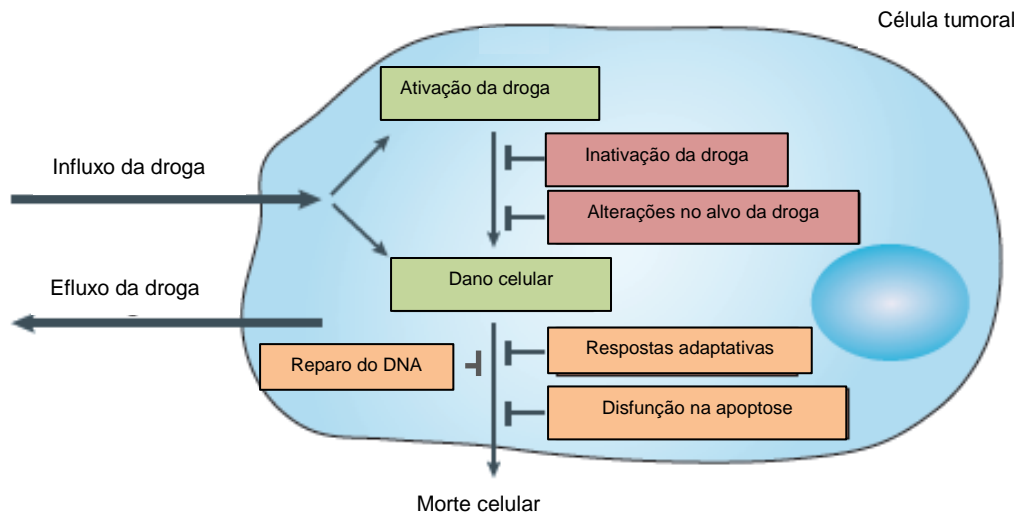


Figura 6. Mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos. Nas células tumorais, a atividade antitumoral de uma droga pode ser limitada devido a mecanismos como influxo diminuído ou efluxo excessivo; inativação ou perda de ativação da droga; alterações nos níveis de expressão de alvos da droga; ativação de respostas adaptativas; diminuição da morte celular devido à disfunção nos processos apoptóticos ou reparo dos danos ao DNA. Adaptado de Holohan et al., 2013.

A redução da acumulação da droga nas células pelo aumento do efluxo por proteínas da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) é um dos principais mecanismos de resistência tumoral estudados. Três transportadores ABC: MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*) estão associados a cânceres resistentes à drogas, com uma ampla especificidade de substratos, sendo capazes de aumentar o efluxo de várias drogas, como alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas, antraciclinas, taxanos e inibidores de cinases [revisado por Housman et al., 2014].

Já o metabolismo das drogas pode ser alterado através de inativação ou falha na ativação das drogas. Drogas platinadas podem ser inativadas por tióis e glutatona, enquanto antimetabólitos como 5-fluoruracil e metotrexato podem não ser convertidos a seus metabólitos mais ativos caso a atividade das enzimas relevantes esteja ausente. Da mesma forma, a resistência a capecitabina pode ser resultante da metilação da enzima timidina fosforilase, tornando-a inativa, o que impede a conversão da capecitabina ao seu metabolito ativo 5-fluoruracil [revisado por Holohan et al., 2013].

Os alvos moleculares das drogas também podem sofrer modificações através de mutações ou alterações nos níveis de expressão, levando a resistência. Alterações que ocasionam diminuição nos níveis da Topo II são frequentemente associados à resistência aos inibidores da Topo II, uma vez que menos complexos Topo II-DNA serão formados, e por consequência, menor morte celular irá ocorrer. Outro exemplo é o receptor de andrógeno, que se encontra amplificado em boa parte dos tumores de próstata, de modo que os inibidores destes receptores não conseguem inibir todas as moléculas alvo presentes, tornando os cânceres resistentes [revisado por Housman et al., 2014].

As células tumorais carregam alterações que resultam em um descontrole da sinalização apoptótica, a qual facilita o desenvolvimento tumoral e as metástases. Mutações, ampliações, translocações gênicas e superexpressão dos genes codificantes de proteínas anti-apoptóticas, como os membros da família BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs – *inhibitors of apoptosis proteins*) e o inibidor de caspase 8 c-FLIP, assim como a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a BAX (*BCL-2 associated X protein*), estão frequentemente associadas a várias malignidades e ligadas a resistência a quimioterapia e terapias alvo-específico [revisado por Hassan et al., 2014].

Diversos agentes utilizados no tratamento do câncer agem através da geração de danos ao DNA que levam a morte celular diretamente ou após o processamento das lesões. A eficácia destes agentes pode ser influenciada pela capacidade das células em reparar estes danos ao DNA, com o aumento da atividade das vias de reparo frequentemente levando a resistência tumoral [revisado por Helleday et al., 2008]. Drogas inibidoras destas vias de reparo ou da resposta aos danos ao DNA (*DNA*

Damage Response – DDR) têm potencial para sensibilizar estas células, enquanto vias perdidas em alguns tumores podem ser exploradas, utilizando drogas que induzem lesões específicas que não serão reparadas, sendo mais citotóxicas e causando mais dano ao DNA [revisado por Curtin, 2012]. Além disso, células tumorais frequentemente têm disfunção em alguma via de reparo, o que pode levar a uma completa dependência de uma via alternativa que é funcionalmente redundante em células normais, e pode ser inibida a fim de induzir morte celular específica das células tumorais [revisado por Holohan et al., 2013].

1.5 Vias de reparo de danos ao DNA

Diariamente, nosso organismo está exposto a uma série de agentes que induzem lesões no nosso DNA, sejam elas geradas por processos endógenos ou por agentes externos. O metabolismo celular normal gera ERO que podem oxidar bases do DNA e gerar SSB, assim como erros na replicação do DNA podem ocasionar incorporação errônea de bases, podendo gerar mutações. Da mesma forma, agentes externos, como a radiação ultravioleta na luz solar e compostos presentes na fumaça do cigarro ou de indústrias químicas, podem induzir uma série de lesões no nosso DNA [Ciccia & Elledge, 2010; revisado por Lord et al., 2012].

A manutenção da integridade do genoma envolve um elaborado aparato a fim de controlar estes danos ao DNA. Este aparato atua sobre diversos sistemas, como o de verificação de danos, transdução de sinais e sistemas efetores conectados a replicação, transcrição, recombinação, remodelamento da cromatina e diferenciação, além de vias de reparo destes danos ao DNA. Além disto, a integridade dos telômeros e do DNA mitocondrial também é altamente controlado. A manutenção de todo este sistema é fundamental para determinar o destino das células: sobrevivência, senescência replicativa ou morte [revisado por Hoejmakers, 2009].

Para enfrentar os diferentes tipos de danos ao DNA, diversos mecanismos de reparo de danos estão envolvidos, atuando sobre tipos específicos de lesões. O reparo do DNA é um processo bioquimicamente complexo, que envolve inúmeras proteínas, formando complexos proteicos que serão utilizados de acordo com a natureza do dano

ou sua extensão. Porém, conforme citado anteriormente, as vias de reparo de DNA podem alterar a eficácia do tratamento do câncer (figura 7). A seguir serão citadas as principais vias de reparo relacionadas à resposta aos quimioterápicos.

1.5.1 Reparo Direto

A via de reparo direto é a mais simples entre os mecanismos de reparo de danos ao DNA, envolvendo apenas uma proteína no processo de reparo do dano. A enzima O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) atua de maneira solitária na remoção de lesões do tipo alquilações na posição 6 de guaninas. O reparo ocorre através da transferência do grupo alquila da base para um resíduo cisteína da MGMT, o que a torna inativa e resulta na sua degradação [revisado por Kelley et al., 2014].

Lesões do tipo O⁶-metilguaninas ou outras alquilações na posição 6 das guaninas, que são induzidas por drogas como a temozolamida, dacarbazina e nitrosouréias, podem ser removidas pela ação da MGMT e tumores com alta expressão desta proteína são frequentemente associados a resistência a essas drogas [revisado por Curtin et al., 2012].

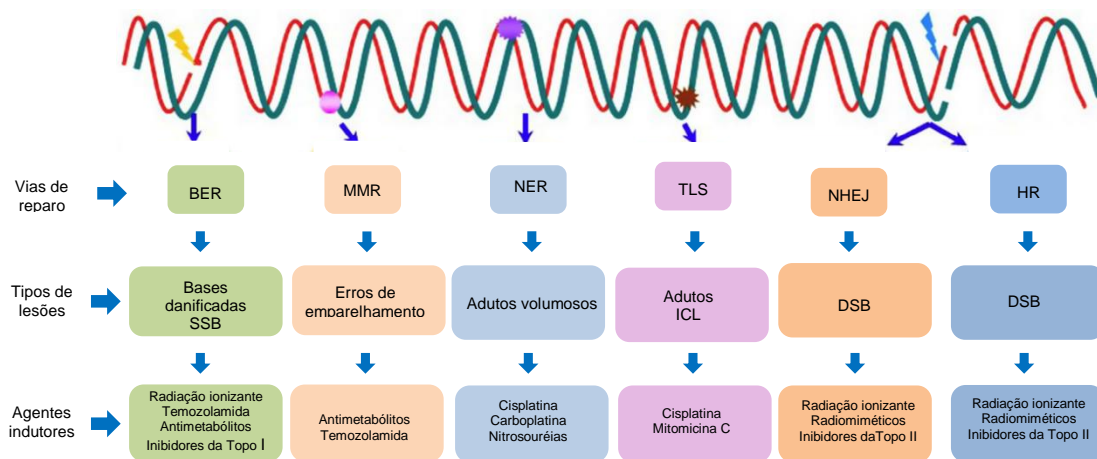


Figura 7. Principais vias de reparo de danos ao DNA envolvidas na resposta aos quimioterápicos. No esquema são demonstrados as principais vias de reparo, os principais tipos de lesões e os agentes indutores das mesmas. BER (*Base excision repair*), MMR (*Mismatch repair*), NER (*Nucleotide excision repair*), TLS (*translesion synthesis*), NHEJ (*Non-homologous end-joining*) e HR (*Homologous recombination*). Adaptado de Tian et al., 2015.

1.5.2 Reparo por excisão de bases

A via de reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair* – BER) é uma via altamente coordenada, com múltiplos passos, que remove bases danificadas do DNA e as substitui pelas bases corretas. Essas bases danificadas podem ser geradas por desaminação espontânea, oxidação por ERO ou por alquilação. O início da via BER ocorre pelo reconhecimento e excisão da base danificada por uma DNA glicosilase, formando sítios abásicos (apurínicos/apirimidínicos – sítios AP). O sítio AP resultante é processado por AP-endonucleases específicas, levando a interrupções de cadeia simples (SSB), sendo então ser preenchidas pela ação de uma DNA polimerases, seguidas por um passo de ligação, restaurando a cadeia do DNA [Altieri et al., 2008; Fu et al., 2012]. A enzima PARP-1 (poli (adenosina difosfato ADP-ribose) polimerase) tem um papel fundamental no reparo de SSB através da via de reparo BER, sendo ativada por quebras no DNA [Javle & Curtin, 2011].

Agentes alquilantes, platinados, antibióticos citotóxicos e taxanos criam lesões normalmente reparadas pela via BER, desta forma, a inibição desta via é interessante para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Um exemplo destes agentes são os inibidores da PARP-1, que estão sendo usados principalmente em tumores de mama e ovário que apresentam mutações nos genes BRCA1 (*Breast Cancer 1*) ou BRCA2 (*Breast Cancer 2*). Esses tumores são deficientes no reparo de DSB pela via de recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR), que seria a via alternativa para compensar a falta da PARP-1, potencializando desta forma os efeitos da quimioterapia [revisado por Holohan et al., 2013].

1.5.3 Reparo de quebras duplas

As DSB são lesões extremamente perigosas, que se não reparadas resultam em perda massiva da informação genética, aberrações cromossômicas ou morte celular. As DSB podem ocorrer naturalmente como resultado da ação das topoisomerases no desenrolamento do DNA ou serem induzidas por radiação ionizante ou quimioterápicos, ocorrendo frequentemente quando a forquilha de replicação para e quebra em locais com danos não reparados. As principais vias para reparo de DSB são as vias de HR e

NHEJ, as quais diferem na fidelidade e no requerimento de molde para execução do reparo [Mao et al., 2008; Kelley et al., 2014].

A via HR é um processo altamente complexo, que envolve múltiplas proteínas, ocorrendo durante as fases S e G2 do ciclo celular. Durante o reparo, as extremidades quebradas do DNA são ressecadas para permitir a invasão da cadeia simples na cromátide irmã, em busca de uma região que apresente homologia, funcionando como um molde para a fiel ressíntese do DNA danificado. Apesar de ocorrer em menor proporção nas células, o reparo de DSB via HR é bastante crítico, devido à alta fidelidade na síntese do filamento de DNA danificado [Shrivastav et al., 2008; Curtin, 2012]. Já a via NHEJ representa a via mais simples e rápida para reparo de DSB, sendo ativa em todas as fases do ciclo celular, especialmente durante G0/G1. A via NHEJ religa diretamente duas extremidades quebradas do DNA, com mínimo processamento das mesmas, independente da homologia de sequência. Devido a esta característica, a via NHEJ é considerada uma via propensa a erros, uma vez que deleções e inserções podem ocorrer durante a religação das cadeias do DNA [Kelley et al., 2014; Waters et al., 2014].

Apesar de poucos defeitos na via NHEJ estarem associadas a tumores, a frequência relativamente alta de defeitos na via HR pode ser a base para a eficácia da terapia citotóxica, provendo subsídios para o desenvolvimento de inibidores da HR de modo a aumentar a sensibilidade ao tratamento. Algumas moléculas inibidoras diretas ou indiretas das vias HR ou NHEJ estão sendo utilizadas em ensaios clínicos atualmente. Além disso, como já citado anteriormente, tumores deficientes em HR (deficientes em BRCA1 e BRCA2) são seletivamente mortos pelos inibidores da PARP-1, sendo esta estratégia já utilizada na clínica [Curtin et al., 2012; Kelley et al., 2014].

1.5.4 Reparo de erros de emparelhamento

A incorporação errônea de nucleotídeos ou a formação de alças de inserções e deleções durante a replicação podem gerar o emparelhamento incorreto das bases no DNA, causando distorções na dupla hélice. A via de reparo de erros de emparelhamento (*Mismatch Repair – MMR*) remove estes erros através da excisão do fragmento recém-

sintetizado que contém o erro e da ressíntese do DNA no seu lugar [Lord et al., 2012; Bridge et al., 2014].

Ao contrário das demais vias de reparo, onde a superexpressão geralmente é associada à resistência dos tumores ao tratamento, a deficiência da via MMR torna os tumores resistentes a algumas drogas, como carboplatina, cisplatina e antimetabólitos como a 6-tioguanina. Isto pode ser explicado porque o MMR realiza diversos ciclos fúteis de remoção da base recém-incorporada no lugar da base danificada, o que pode vir a ser deletério para a célula. Neste sentido, agentes demetilantes estão sendo associados a agentes platinados, com o objetivo de reverter a hipermetilação do gene *MLH1* (*Mut-L homologue 1*) que está associada à diminuição da atividade do MMR, aumentando a eficácia da quimioterapia [Helleday et al., 2008; Holohan et al., 2013].

1.5.5 Reparo por excisão de nucleotídeos

Entre as diferentes vias de reparo existentes, a via de reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair – NER*) pode ser considerada a mais excepcional de todas, devido a sua habilidade em reparar uma ampla gama de lesões que alteram significativamente a dupla hélice do DNA, causando grandes distorções na sua estrutura, impedindo o pareamento correto das bases ou bloqueando a replicação e a transcrição. Essas lesões incluem adutos volumosos como os dímeros de pirimidina (cyclobutane-pyrimidine dimers – CPDs) e os 6-4 fotoprodutos (6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproducts – 6-4PPs), que são as principais lesões induzidas pela radiação ultravioleta (UV); inúmeros adutos químicos, induzidos por mutágenos ambientais ou quimioterápicos; pontes intracadeias causadas por drogas como cisplatina; bem como lesões do tipo ciclopurinas geradas por ERO [Costa et al., 2003; Schärer, 2013; Marteijn et al., 2014]. Além destas, outros tipos de lesões, como ICL e algumas lesões oxidativas podem ter envolvimento de proteínas da via NER na resolução das mesmas [Wood, 2010; Spivak & Ganesan, 2014].

A via é coordenada pela ação de cerca de 30 proteínas, sendo que deficiências em pelo menos uma entre dez destas proteínas são diferentemente associadas a desordens genéticas como Xeroderma pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne

(*Cockayne Syndrome* - CS) e *Tricotiodistrofia* (TTD). As manifestações clínicas destas doenças diferem significativamente, incluindo dois fenótipos bem distintos, como a elevada predisposição ao câncer de pele, para os pacientes XP, ou a progeria, sem aumento da incidência de câncer para os pacientes CS e TTD. A característica comum a todos estes pacientes é a fotossensibilidade, que pode ser manifestada em diferentes níveis [Costa et al., 2003; Marteiijn et al., 2014].

De uma maneira resumida, os passos da via NER incluem o reconhecimento de uma distorção estrutural ou alteração química no DNA; verificação do dano e montagem de um complexo pré-incisão; incisões na cadeia danificada em cada lado da lesão; remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão; ressíntese da sequência deletada utilizando a cadeia complementar como molde; e finalmente, ligação do fragmento recém-sintetizado à cadeia pré-existente (figura 8) [Hanawalt et al., 2003; Schuck et al., 2008].

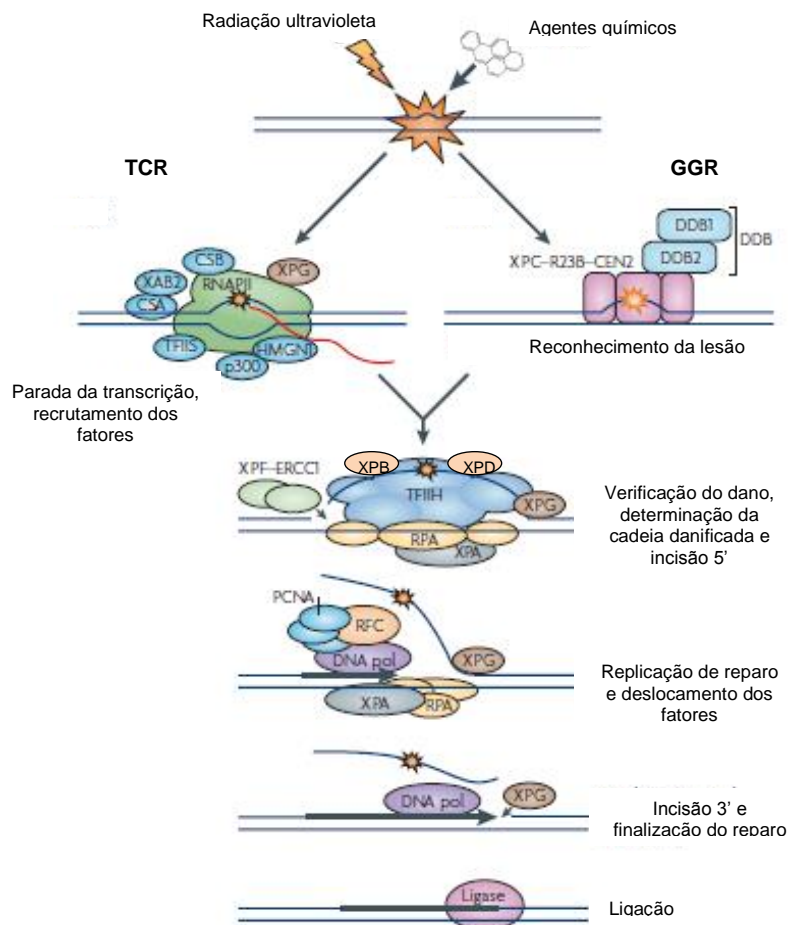


Figura 8. Representação esquemática da via NER. As lesões são inicialmente reconhecidas, através da parada da RNA polimerase na subvia associada à transcrição (TCR - *Transcription coupled repair*) ou

pelo reconhecimento da distorção da dupla hélice na subvia de reparo global do genoma (GGR – *Global genome repair*). Após esta etapa inicial, as subvias convergem para uma via comum, na qual ocorre a verificação do dano e incisão do mesmo, com a síntese da nova cadeia, seguida pela religação da cadeia, restaurando a cadeia intacta de DNA. Adaptado de Hanawalt & Spivak, 2008.

A via NER é dividida em duas subvias: associada à transcrição (*Transcription-coupled Repair – TCR*) e de reparo global do genoma (*Global Genome Repair – GGR*). A subvia TCR reconhece e repara lesões na cadeia do DNA que está sendo transcrita, em genes ativos, sendo reparadas com prioridade em relação ao resto do genoma. Já a subvia GGR, engloba o NER em regiões não codificantes do genoma, em genes silenciosos, e também na cadeia que não está sendo transcrita de genes ativos. Além do local da lesão, as duas subvias diferem também nas proteínas envolvidas no processamento inicial destas lesões [Noussipikel, 2009; Kamilleri et al., 2012].

1.5.5.1 Reconhecimento das lesões - TCR

A parada da maquinaria de transcrição em função de danos no DNA afeta severamente as funções celulares e a sobrevivência, inibindo a produção de transcritos essenciais, bloqueando a replicação e sinalizando vias de morte celular. Por outro lado, caso a RNA polimerase (RNA Pol) consiga ultrapassar estas lesões, podem ser gerados transcritos com mutações, deletérios para a célula [Spivak & Ganesan, 2014].

O bloqueio da RNA Pol ao encontrar obstáculos para o progresso da transcrição é o passo inicial do TCR, tornando desnecessária a participação de outras proteínas para o reconhecimento da lesão. A proteína CSB (*Cockayne Syndrome complementation group B*) interage fracamente com a RNA Pol e estimula a transcrição, mas se torna mais fortemente ligada quando ocorre a parada da transcrição. CSB é uma proteína de 168 kDa, membro da família de proteínas SNF2 de ATPases dependentes de DNA (envolvidas em remodelamento da cromatina), que modifica a conformação do DNA, alterando a interface entre a RNA Pol e o DNA, sendo considerada o principal regulador do TCR. CSB recruta a proteína CSA (*Cockayne Syndrome complementation group A*) para a matriz nuclear após o dano no DNA. CSA é uma proteína de 44 kDa, parte do complexo E3-ubiquitina ligase, necessária para estabilização da CSB, e juntamente com

a mesma, faz o recrutamento das proteínas HMGN1 (*High mobility group nucleosome binding domain 1*), XAB2 (*XPA binding protein 2*) e TFIIIS (*Transcription factor II-S*) para o local do dano. A interação específica de XAB2 com a proteína XPA (*Xeroderma pigmentosum complementation group A*), que é essencial para ambas as subvias TCR e GGR, sugere que esta possa ser a proteína chave na junção das duas subvias, para a qual todos os passos subsequentes são compartilhados [Costa et al., 2003; Hanawalt & Spivak, 2008; Kamilleri et al., 2012; Spivak & Ganesan, 2014].

1.5.5.2 Reconhecimento das lesões – GGR

Apesar da via GGR agir sobre lesões no DNA do genoma como um todo, a cinética de reparo destas lesões pode ser influenciada por diversos parâmetros relacionados à estrutura da lesão e configuração da cromatina. Diferente do TCR, onde o bloqueio da RNA Pol é suficiente para desencadear o processo de reparo, na subvia GGR são necessárias proteínas específicas para o reconhecimento destas lesões. Desta forma, o passo de reconhecimento da lesão é um limitante da velocidade do reparo, considerando que a força da ligação das proteínas no reconhecimento do dano depende da estrutura química da lesão, bem como o modo como estas interferem na estrutura da dupla hélice [Hanawalt et al., 2003; Altieri et al., 2008].

O complexo sensor das distorções no DNA na subvia GGR é composto das proteínas XPC (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*), HR23B e centrin-2. A XPC é uma proteína de ligação ao DNA com forte preferência por DNA danificado, ligando preferencialmente à sequência de DNA de cadeia simples que ocorre na cadeia não danificada, tendo papel fundamental como sensor das lesões no complexo. Além disso, XPC é poliubiquitinada após dano no DNA, num processo reversível, que não resulta na sua degradação, mas aumenta sua afinidade pelo DNA. Para algumas lesões, como as induzidas por UV, notavelmente CPDs, ainda é necessária a participação das proteínas UV-DDB (*UV-damaged-DNA-binding protein*), as quais consistem de duas unidades: DDB1 e DDB2 (também chamada XPE – *Xeroderma pigmentosum complementation group E*). Após a ligação deste complexo ao dano, ocorre o recrutamento das demais proteínas, que são comuns as duas subvias do NER [Hanawalt et al., 2003; Schuck et al., 2008; Nospikel, 2009; Kamilleri et al., 2012].

1.5.5.3 Verificação da lesão e montagem do complexo pré-incisão

A partir da etapa de reconhecimento, as subvias convergem para uma via em comum. Ocorre a montagem de um complexo proteico para verificação do dano e preparo do local contendo a lesão para a incisão da mesma. O fator de transcrição TFIIH é então recrutado, juntamente com a proteína XPG (*Xeroderma pigmentosum complementation group G*), a qual é responsável por sua estabilização. TFIIH é composto de dez subunidades. Outros componentes do complexo são as helicases e DNA-dependente ATPases XPB e XPD (*Xeroderma pigmentosum complementation group B e D*), p62, p52, p44, p34, TTDA e CAK. As proteínas XPB e XPD têm funções complementares: enquanto XPB desenrola o DNA na direção 3'-5', XPD atua na direção contrária, ocasionando a abertura da região ao redor da lesão [Costa et al., 2003; Schärer, 2013].

As proteínas XPA e RPA (*Replication protein A*) podem estar presentes antes ou após o recrutamento de TFIIH (*Transcription factor II-H*). Estas proteínas atuam na checagem da lesão, na proteção do DNA de fita simples e na estabilização do complexo pré-incisão, servindo como subunidades regulatórias que verificam o recrutamento das demais proteínas, bem como a correta montagem dos intermediários da etapa de incisão. XPB e XPD ainda fazem uma melhor verificação do dano a fim de determinar qual cadeia do DNA contém a lesão. Além disso, a proteção da cadeia não danificada pela ação da proteína RPA também auxilia neste processo, obviamente, de modo que a incisão seja feita apenas na cadeia contendo o dano. O recrutamento da proteína XPF-ERCC1 (*Xeroderma pigmentosum complementation group F – Excision Repair Cross-complementing-1*), através da interação com a proteína XPA, finaliza a montagem do complexo pré-incisão [Costa et al., 2003; Hanawalt et al., 2003; Schärer, 2013; Marteijn et al., 2014].

1.5.5.4 Excisão do dano, síntese de reparo e ligação das cadeias

A etapa seguinte é a incisão da cadeia, que ocorre em ambos os lados e poucos nucleotídeos além da região contendo a lesão, pela ação coordenada das endonucleases

XPF-ERCC1 e XPG, removendo uma sequência de cerca de 25 a 30 nucleotídeos. O complexo XPF-ERCC1 incisa a cadeia danificada no lado 5' da lesão. A proteína XPF é a responsável pela atividade endonuclease, enquanto ERCC1 parece ter apenas papel na estabilização da XPF. Esta etapa requer a presença, mas não a atividade catalítica da endonuclease XPG, a qual faz a incisão seguinte, no lado 3' da cadeia danificada. Interessantemente, após a incisão pela XPF-ERCC1, a síntese de reparo já pode ser iniciada antes mesmo da incisão pela XPG, minimizando a quantidade de DNA de cadeia simples exposto durante o processo, a qual poderia induzir uma sinalização de danos no DNA [Costa et al., 2003; Hanawalt & Spivak, 2008; Nospikel, 2009; Schärer, 2013].

Em seguida à reação de excisão, o oligonucleotídeo contendo a lesão é liberado, juntamente com o fator TFIIH ligado a ele. A incisão pela XPF-ERCC1 gera extremidades 3' com grupos hidroxila livres, os quais podem ser usados para iniciar a síntese de reparo. Por outro lado, as incisões feitas pela XPG não produzem estes intermediários, gerando desta forma, apenas as extremidades livres 5'fosfato que serão úteis no processo de ligação. A síntese de reparo é executada pela ação das proteínas da replicação PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), RFC (*Replication Factor C*), RPA e as DNA polimerases (DNA Pol δ , ϵ e/ou κ). A partir da síntese, ocorre a ligação dos fragmentos pelas DNA ligases I ou XRCC1-DNA ligase III. As proteínas exatas envolvidas nestas etapas dependem do estado proliferativo das células. DNA Pol ϵ e DNA ligase I atuam principalmente em células que estão em replicação ativa, enquanto DNA Pol δ ou κ e XRCC1-DNA ligase III atuam principalmente em células em estado não replicativo, onde tanto a concentração de nucleotídeos quanto a expressão da DNA ligase I, são baixas [Hanawalt & Spivak, 2008; Schärer, 2013; Marteijn et al., 2014].

1.5.5.5 NER e reparo de ICL

As lesões do tipo ICL são extremamente tóxicas, pois afetam a informação genética de ambas as cadeias do DNA, impedindo a sua separação e conseqüentemente, bloqueando a replicação e a transcrição, com efeitos tóxicos e mutagênicos para as células. Diversos agentes quimioterápicos agem formando ICL, como melfalano, clorambucil, mitomicina C, agentes platinados (como a cisplatina) e nitrosouréias

(como a carmustina), portanto, o reparo destas lesões também influencia a resposta ao tratamento [Wood, 2010; Deans & West, 2011].

O principal mecanismo de reparo das ICL é acoplado à replicação do DNA na fase S, envolvendo proteínas de diversas vias, como da via da Anemia de Fanconi (*Fanconi Anemia pathway - FA*), HR, síntese translesão (*Translesion Synthesis – TLS*) e NER. De uma maneira resumida, quando a forquilha de replicação converge e encontra uma ICL, ela para cerca de 20 a 40 nucleotídeos antes da lesão. Após reconhecimento, são feitas incisões de cada lado da lesão por nucleases, soltando a ICL de uma das cadeias e permitindo a ultrapassagem desta lesão por polimerases especializadas. A DSB resultante pode ser reparada pela via HR, sendo que a ICL remanescente que ficou pendurada na outra cadeia pode ser removida pela ação de nucleases [Klein Douwel et al., 2014; Zhang e Walter, 2014]. Apesar de várias nucleases poderem estar envolvidas nestas clivagens, estudos demonstram que XPF-ERCC1 (nucleases da via NER) seriam os melhores candidatos, podendo atuar nas diferentes etapas de clivagem da ICL, tanto na clivagem inicial nas extremidades 5' ou 3' da ICL, quanto no processamento final da ICL remanescente na cadeia oposta (figura 9) [Klein Dowel et al., 2014; Zhang e Walter, 2014; Manandhar et al., 2015].

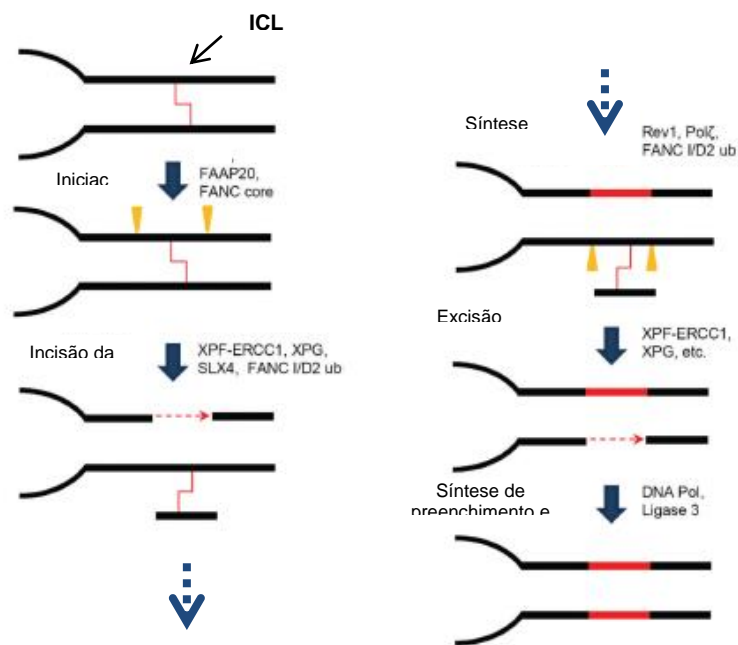


Figura 9. Representação esquemática de uma das vias de reparo de pontes intercadeias (ICL – *Interstrand crosslink*). Após o reconhecimento inicial da lesão, ocorre a incisão da ICL pela ação de nucleases e o reparo via síntese translesão restaura a fita contendo a incisão. A ICL remanescente é excisada pela ação

de nucleases, como XPF/ERCC1, ocorrendo então a síntese de preenchimento e religação das fitas, restaurando o DNA. Adaptado de Huang & Li, 2013.

A atuação de XPF-ERCC1 no reparo de ICL é bem demonstrada, entretanto, apesar da participação da via NER como um todo não estar bem determinada, foi demonstrado que outras proteínas da via (XPA, XPG, XPF, XPC, XPD, CSA e CSB) podem atuar na remoção de ICL induzidos por mitomicina C [Zheng et al., 2003]. Além disso, o reparo de ICL, mas não pontes intracadeias, induzidos por cisplatina, é comprometido em células com deficiências das proteínas XPA, XPF e XPG, podendo ser reparado em uma via independente da replicação e associada à transcrição, com participação da proteína CSB (via TCR) e proteínas da via TLS [Enoiu et al., 2012]. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que a proteína CSB interage com SNM1 (*Sensitive to Nitrogen Mustard 1A*), uma exonuclease que atua no reparo de ICL, modulando sua atividade nucleasa na resolução de ICL induzidas por psoralenos, reforçando a participação da CSB na resposta a ICL independente da replicação [Iyama et al., 2015].

1.5.5.6 NER e reparo de lesões oxidativas

As lesões oxidativas são reparadas primariamente pela via BER, entretanto, diversos estudos associam proteínas da via NER à resposta a estas lesões. Células CSB (assim como CSA) apresentam elevada sensibilidade a H₂O₂ e outros agentes indutores de estresse oxidativo, como radiação ionizante e bromato de potássio, sendo defectivas no reparo de lesões como 8-oxoguanina e ciclopurinas [revisado por Hannawalt & Spivak, 2008; D'Errico et al., 2013]. Estudos demonstraram que a proteína CSB interage com PARP-1, estimula a atividade de glicosilases (Nei1 e APE1) e/ou afeta a transcrição de OGG1, todas estas enzimas chave do reparo via BER, entretanto, a ligação exata entre estas duas vias no reparo de lesões oxidativas ainda não está determinada [revisado por D'Errico et al., 2013; Melis et al., 2013]. A remoção de 8-oxoguanina no DNA mitocondrial também é dependente da ação da proteína CSB, influenciando o reparo através da regulação da expressão de OGG1 e também do

recrutamento/associação das proteínas da via BER na matriz mitocondrial interna [Stevnsner et al., 2002; Stevnsner et al., 2008; Aaman et al., 2010].

Apesar da maioria dos estudos indicarem a participação da CSB na resposta a lesões oxidativas, Menoni e colaboradores [2012] demonstraram que além de CSB, a proteína XPC também é recrutada a sítios de dano oxidativo, sem recrutamento de outras proteínas da via NER (XPA e XPB), indicando que apesar de ocorrer o recrutamento dos fatores iniciais da via, não seria desencadeada a via clássica de reparo. Mais recentemente foi demonstrada que a remoção de lesões do tipo 8-oxoguanina da cadeia transcrita de genes requer além de CSB, também a participação de XPA, num modelo no qual o reparo iniciaria pela via BER e finalizaria com a via clássica NER [Guo et al., 2013].

1.5.5.7 NER e a resposta aos quimioterápicos

Conforme citado anteriormente, a via NER tem papel no desenvolvimento de tumores, principalmente câncer de pele em pacientes XP, enquanto polimorfismos em alguns genes da via NER também estão associados à predisposição a certos tipos de câncer. Entretanto, apesar do seu papel no desenvolvimento de câncer, a capacidade da via NER também é relevante no contexto do tratamento, uma vez que diversos quimioterápicos agem via formação de lesões do tipo adutos (principais lesões removidas pela via NER), podendo modular a resposta a estas drogas [Schuck et al., 2008].

A cisplatina, que age principalmente via formação de adutos volumosos no DNA, é usada no tratamento de diversos tipos de tumores, incluindo câncer de testículo, que geralmente apresenta baixos níveis das proteínas XPA, XPF e ERCC1 e elevados índices de cura [Welsh et al., 2004; McGurk et al., 2006; Holohan et al., 2013]. Por outro lado, a expressão elevada destas mesmas proteínas já foi observada em linhagens celulares e/ou tecidos de tumores como ovário, gástrico, pulmão e colorretal, sendo associadas à resistência à cisplatina, enquanto alguns tumores com baixa expressão ou certos polimorfismos das proteínas do NER apresentam sensibilidade a esta mesma droga [revisado por Bowden, 2014].

A oxaliplatina também forma uma variedade de *crosslinks* no DNA e monoaddutos que podem ser excisados via NER. A combinação de oxaliplatina com fludarabina, um análogo de nucleotídeo que inibe a síntese de DNA, potencializa a morte de células de leucemia linfocítica [Zecevic et al., 2011]. Após o tratamento com oxaliplatina, o reparo das lesões requer a síntese do novo fragmento de DNA no lugar do que foi excisado. Na presença de fludarabina ocorre a incorporação errônea da droga, promovendo a morte celular. Esse sinergismo é dependente da ação da XPF, uma vez que na ausência desta nuclease não se observam benefícios na combinação das drogas [Zecevic et al., 2011].

Apesar da versatilidade da via NER no reparo de diversos tipos de lesões, o seu envolvimento na resposta a quimioterapia do câncer é geralmente relacionado a estudos de tratamentos com drogas como a cisplatina e derivados platinados ou outras classes de drogas indutoras de ICL. Considerando que as drogas inibidoras da Topo II, além da inibição da enzima, agem também através da formação de outras lesões e são amplamente utilizadas no tratamento de diferentes tumores, é de grande relevância o conhecimento das vias de reparo relacionadas à resposta a estas drogas. A seguir serão descritos os principais mecanismos envolvidos nesta resposta.

1.6 Reparo de lesões induzidas por inibidores da Topo II

Os danos ao DNA induzidos por inibidores da Topo II podem ser reparados por múltiplas vias. Considerando que estes danos incluem quebras de cadeia e proteínas ligadas covalentemente ao DNA (complexos Topo II-DNA), o reparo das lesões requer vias de reparo de DSB e outras vias específicas para remoção de adutos proteína-DNA [Nitiss, 2009].

Uma das principais lesões induzidas pelos inibidores da Topo II são os complexos Topo II-DNA, no quais a enzima fica ligada covalentemente ao DNA. Uma maneira interessante de reparar este dano é a remoção direta da enzima através da clivagem da ligação tirosina-fosfato que liga a Topo II ao DNA, gerando extremidades livres que podem ser reparadas por mecanismos de reparo de quebras no DNA [Nitiss & Nitiss, 2013]. A compreensão deste mecanismo iniciou com a descoberta de que a

enzima TDP1 (*Tyrosyl DNA-phosphodiesterase 1*) apresentava forte atividade contra ligações 3' fosfotirosil induzidas por inibidores da Topo I e estaria implicada na remoção da Topo I ligada ao DNA [Pouliot et al., 1999]. Como a capacidade da TDP1 remover proteínas ligadas a extremidade 5' (do tipo que ocorre após tratamento com inibidores da Topo II) era bastante limitada, ocorrendo de maneira pouco eficiente, outra enzima deveria ser responsável pela remoção da proteína ligada ao DNA [revisado por Pommier et al., 2014].

Cortés Ledesma e colaboradores [2009] descobriram que a proteína inicialmente chamada TTRAP (*TRAF and TNF receptor associated protein*), apresentava forte atividade na remoção de peptídeos ligados a uma extremidade 5' via ligações do tipo fosfotirosil e fraca capacidade de clivar ligações na extremidade 3', concluindo que se tratava de uma enzima do tipo 5'-DNA fosfodiesterase. A enzima atuaria no reparo de lesões induzidas por inibidores da Topo II, através da geração de DSB's com extremidades 5'OH limpas que estariam prontas para junção direta das extremidades, sendo então denominada TDP2 (*Tyrosyl DNA-phosphodiesterase 2*), devido às atividades complementares a TDP1 já descrita anteriormente [Cortés Ledesma et al., 2009]. A deleção desta enzima em diferentes tipos celulares resultou em pouca ou nenhuma sensibilidade a drogas como CPT ou metilmetanosulfonato (MMS) e elevada sensibilidade ao ETO, confirmando a necessidade da TDP2 para o reparo das lesões e resistência a drogas inibidoras da Topo II [Cortés Ledesma et al., 2009; Zeng et al., 2011]. TDP2 é capaz de remover peptídeos ligados na extremidade 3', semelhante a TDP1, atuando de maneira complementar a atividade desta última em resposta a inibidores da Topo I [Zeng et al., 2012]. Gómez-Herreros et al [2013] demonstraram que a atividade 5' fosfodiesterase da TDP2 também é necessária para resistência a outros inibidores da Topo II como DOX e AMSA. As extremidades de DNA limpas resultantes da ação da enzima, facilitam a ligação das DSB via NHEJ, suportando um mecanismo livre de erro. Células deletadas para a proteína Ku70 (componente da via NHEJ) apresentam sensibilidade semelhante a células deletadas para ambas as proteínas Ku70 e TDP2, indicando uma relação epistática, enquanto deleção de TDP2 em células defectivas em HR apresentam uma sensibilidade mais elevada, de modo que TDP2 pode atuar em uma via dependente de NHEJ ou independente de HR no reparo de DSB induzidas por inibidores da Topo II [Gómez-Herreros et al., 2013].

A remoção da Topo II pela TDP2 define um importante mecanismo pelo qual o reparo dos complexos Topo II-DNA é feito, entretanto, a remoção nucleolítica da enzima também pode ser realizada, pela ação do complexo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) em colaboração com as proteínas Ctip/Sae2, sendo que provavelmente a atuação do complexo MRN poderia catalisar os produtos para o reparo via HR [revisado por Nitiss & Nitiss, 2013, Pommier et al., 2014]. Em um destes trabalhos, Lee e colaboradores [2012] demonstraram que a nuclease Mre11, tanto a proteína recombinante obtida de duas diferentes fontes quanto a presente em imunoprecipitados de dois tipos celulares, era capaz de remover a Topo II do DNA genômico, sendo a remoção da isoforma α mais eficiente que a β [Lee et al., 2012]. Outra possibilidade para a remoção dos complexos Topo II-DNA é a degradação proteolítica da Topo II pelo proteassoma. O bloqueio da RNA pol pelos complexos pode desencadear essa degradação, que pode ocorrer de duas formas: dependente de ubiquitinação, com degradação via complexo 26S [Mao et al., 2001] ou independente de ubiquitinação, com degradação via complexo 20S do proteassoma [Ban et al., 2013]. Embora a via de degradação proteassomal seja preferencial para isoforma β [Ban et al., 2013], a degradação da isoforma α também pode ocorrer, porém em taxas mais baixas [Alchanati et al., 2009]. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que os complexos não podem ser processados pela TDP2 sem que antes ocorra a degradação proteolítica da Topo II [Gao et al., 2014]. Apesar do conhecimento destes três mecanismos de remoção dos complexos, a maneira exata como eles ocorrem ainda não está totalmente estabelecida. Porém, o produto final destas vias é a geração de mais dano ao DNA, principalmente DSB, que poderão ser reparadas pelas vias de reparo citadas anteriormente (figura 10).

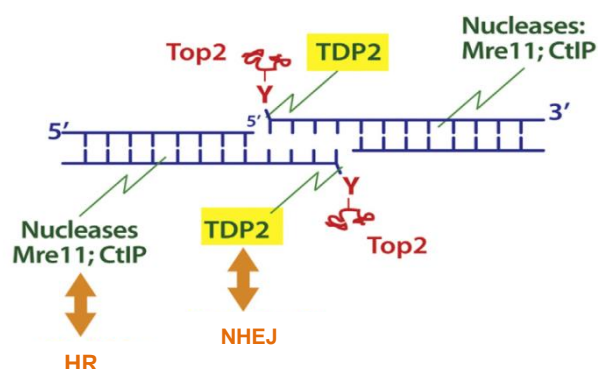


Figura 10. Representação esquemática do reparo de complexos Topo II-DNA. A proteína TDP2 (tirosil-DNA fosfodiesterase 2) hidroliza a ligação tirosil-DNA liberando a Topo II, que pode ser então

degradada pelo proteassoma. Alternativamente, pode ocorrer a remoção do fragmento de DNA ligado covalentemente a Topo II pela ação de nucleases. A finalização do reparo da quebra dupla ocorre pela ação das vias NHEJ (*Non-homologous end-joining*), no caso da TDP2, ou pela via HR (*Homologous recombination*) no caso da ação nas nucleases. Adaptado de Pommier et al., 2014.

Em um estudo com a levedura *Schizosaccharomyces pombe*, foi avaliada a resposta de linhagens deficientes em proteínas de diferentes vias de reparo ao tratamento com TOP-53, uma epipodofilotoxina semelhante ao ETO. Células com mutações em genes codificantes para proteínas da via HR (homólogos de MRE11 e RAD52) apresentaram alta sensibilidade ao TOP-53, assim como células deficientes nos homólogos XPG e ERCC1, nucleases da via NER [Malik & Nitiss, 2004]. Apesar da sensibilidade dos mutantes da via NER não ser tão pronunciada quanto à dos mutantes da via HR, este trabalho sugeriu que proteínas envolvidas na via de reparo por excisão poderiam ainda funcionar na remoção dos adutos DNA-proteína, ou ainda, caso não atuassem na remoção das proteínas ligadas ao DNA, poderiam ser necessárias para o processamento das cadeias do DNA, permitindo o reparo pela via HR ou outra de reparo de quebras no DNA [Malik & Nitiss, 2004].

O tratamento com MXT ou ETO resulta na formação de DSB com a concomitante fosforilação de H2AX, que podem ser observadas a partir do tratamento com baixas doses das drogas [Smart et al., 2008]. Além da fosforilação de H2AX, outras proteínas de sinalização de danos como ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), Chk2 e p53 são ativadas após tratamento com MXT e ETO [Tanaka et al., 2007; Zhao et al., 2008]. A fosforilação das DNA-PKs (*DNA-dependent protein kinase*) também é observada após tratamento com MXT, sendo que a inibição desta fosforilação torna as células mais sensíveis, confirmando a importância destas proteínas no reparo das DSB induzidas pela MXT [Elliot et al., 2010]. Assim como em resposta a MXT, o uso de inibidores da DNA-PK e outras PI-3K cinases (*Phosphatidylinositol-3-kinases*) tornam células tumorais mais sensíveis ao tratamento com ETO e inibem o crescimento de tumores xenograftos em camundongos tratados com esta mesma droga [Munck et al., 2012]. Células deletadas para DNA-PKcs são altamente sensíveis ao ETO [Despras et al., 2007], assim como células deficientes nas proteínas Ku70 e Ligase IV, ambas proteínas da via NHEJ, enquanto células deficientes em RAD54 (da via HR) são

sensíveis, porém em menor intensidade, indicando a prevalência da via NHEJ no reparo das lesões induzidas por esta droga [Adachi et al., 2003]. Células deficientes para a proteína XPC também apresentaram sensibilidade ao ETO, enquanto células sem a proteína XPA apresentaram sensibilidade normal. Estes resultados foram em parte atribuídos à baixa atividade da via NHEJ observada nas células XPC, enquanto células XPA apresentavam atividade normal [Despras et al., 2007].

Recentemente, a resposta ao tratamento com inibidores da Topo I e II em linhagens de células DT40 mutantes para diversas vias de reparo foi analisada. Células deletadas na via NHEJ (Ku70, Ligase IV ou DNA-PKs) foram hipersensíveis ao ETO e ainda apresentaram elevada sensibilidade a DOX, reforçando dados de que a via NHEJ é necessária para reparo de DSB induzidas por inibidores da Topo II [Maede et al., 2014]. Neste mesmo trabalho, células deficientes em proteínas das vias HR e nas proteínas PARP-1 e TDP-1 foram especialmente sensíveis aos inibidores da Topo I, enquanto células deficientes em TDP2 apresentaram sensibilidade aos inibidores da Topo II. Apesar da sensibilidade das células TDP2 a DOX, essa sensibilidade apresentou uma baixa correlação com a sensibilidade ao ETO, confirmando a existência de outros mecanismos adicionais para morte das células além dos complexos Topo II-DNA [Maede et al., 2014]. Interessantemente, células deficientes em algumas proteínas das vias TLS (DNA polimerases) e NER (XPG e XPA) apresentaram certa sensibilidade ao ETO e uma pequena resistência a DOX [Maede et al., 2014].

Como além dos complexos Topo II-DNA, alguns inibidores da Topo II com capacidade intercalante como DOX e MXT também induzem lesões do tipo adutos, ICL e ERO, é esperado envolvimento de outras vias na resposta a estas drogas. Spencer e colaboradores [2008] avaliaram a resposta de células deficientes nas principais vias de reparo ao tratamento com DOX e dois derivados com alta capacidade de formação de adutos (barminomicina e doxoform). Células deficientes nas vias MMR e BER não apresentaram quaisquer diferenças na sensibilidade à barminomicina comparadas às células proficientes, enquanto em resposta a DOX, células deficientes em MMR foram um pouco mais sensíveis [Spencer et al., 2008]. Em um trabalho anterior havia sido demonstrado que células deficientes em MMR apresentavam resistência a diversas drogas, incluindo os inibidores de Topo II DOX, EPI e MXT, sendo este resultado associado à necessidade do MMR para a detecção de adutos no DNA e a sinalização

para vias apoptóticas, semelhante ao que já ocorria com drogas como 6-tioguanina e cisplatina [Fedier et al., 2001]. Já em relação às vias de reparo de DSB, deficiências na via NHEJ e HR resultaram em células mais sensíveis a DOX, porém a via HR parecia ser mais importante para o reparo de lesões causadas por agentes indutores de adutos [Spencer et al., 2008]. De maneira interessante, células deficientes em proteínas da via NER foram levemente mais resistentes às drogas formadoras de adutos, enquanto em resposta a DOX não houve diferença comparada às células proficientes [Spencer et al., 2008].

Trabalhos posteriores do nosso grupo associaram a deficiência em proteínas da via NER a uma maior sensibilidade a inibidores da Topo II. Saffi e colaboradores [2010] demonstraram que a deficiência da helicase XPD torna as células altamente sensíveis a DOX, porém, essa sensibilidade ocorre somente após tempos mais longos de tratamento, uma vez que após curta exposição à DOX a sensibilidade é semelhante à das células proficientes [Saffi et al., 2010], sendo que este resultado após curtos tratamentos está de acordo com o demonstrado por Spencer e colaboradores para células deficientes na proteína XPD ou outras proteínas da via NER [Spencer et al., 2008]. Quando as células foram avaliadas para sua capacidade de reparo via NER, através do ensaio UDS (*Unscheduled DNA synthesis*), as células XP apresentaram uma baixa atividade de reparo após tratamento com DOX, comparadas a elevada atividade nas células proficientes, sugerindo que parte das lesões induzidas pela DOX é reparada via NER [Saffi et al., 2010]. Neste mesmo trabalho, o silenciamento da Topo II tornou as células mais resistentes a DOX, entretanto, células XPD ainda foram mais sensíveis, indicando que outras lesões além das DSB induzidas pelo bloqueio da Topo II eram responsáveis pela elevada sensibilidade das células deficientes, sendo que estas lesões necessitariam da via NER para resolução das mesmas [Saffi et al., 2010].

Em resposta à cosmomicina D, uma antraciclina isolada de *Streptomyces olindensis*, fibroblastos deficientes nas proteínas XPA e XPC também apresentam elevados índices de apoptose comparados às células proficientes, bem como em resposta a DOX [Carvalho et al., 2010]. Mais recentemente, o envolvimento da proteína XPA no reparo de lesões induzidas pela DOX foi avaliado. No trabalho de Moraes e colaboradores [2012], células XPA apresentaram-se mais sensíveis a DOX e com taxas de apoptose mais elevadas que células proficientes em reparo. Quando as células foram

co-tratadas com DOX e um inibidor de cinases (envolvidas na resposta ao dano ao DNA e reparo), os efeitos da DOX foram potencializados, indicando que a deficiência no processo de reparo mediado pela XPA pode contribuir para o sinergismo entre as drogas, sendo estes mesmos efeitos observados para células deficientes na polimerase η (ou XPV - *Xeroderma pigmentosum complementation group V*) envolvida no reparo de danos via TLS [Moraes et al., 2012]. Por outro lado, deficiência da endonuclease XPF não ocasionou aumento da sensibilidade a DOX, o que talvez pudesse ser atribuído a uma atividade residual do NER nestas células, que não é observado em células XPA [Moraes et al., 2012]. O papel de proteínas da via NER na resposta a DOX foi reforçado através da demonstração de que células deficientes nas proteínas XPA, XPD, XPC e também CSB apresentam elevada sensibilidade a DOX, mesmo quando tratadas com doses mais baixas que as utilizadas nos trabalhos anteriores [de Souza, 2014].

Considerando os trabalhos demonstrando a participação de proteínas da via NER na resposta ao tratamento com DOX, bem como as similaridades estruturais e de mecanismo de ação entre a DOX e a MXT, é interessante pensar que a via NER também possa participar da resposta a lesões induzidas pela MXT. Desta forma, o estudo dos mecanismos pelos quais a MXT exerce seus efeitos sobre células deficientes em NER, bem como a maneira como as células reparam os danos induzidos pela MXT, levariam a uma melhor compreensão dos fatores que podem afetar os resultados do tratamento, tanto através da resistência das células, como também a uma maior sensibilidade de alguns tumores a esta droga.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) na citotoxicidade do antineoplásico mitoxantrona (MXT).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade a MXT em células deficientes e proficientes na via NER.
- Determinar o mecanismo de morte celular destas células após tratamento com MXT.
- Avaliar o índice de danos ao DNA e o reparo destes danos após tratamento com MXT.
- Determinar o perfil de ciclo celular das células tratadas com MXT.
- Avaliar a síntese de DNA após o tratamento das células com MXT.
- Verificar a formação de espécies reativas de oxigênio após tratamento com MXT.
- Avaliar a formação e reparação dos complexos Topo II-DNA após tratamento com MXT.
- Verificar a sensibilidade e a formação dos complexos Topo II-DNA em resposta a MXT em células deficientes complementadas com a proteína CSB selvagem.
- Avaliar os efeitos do ETO sobre a viabilidade celular de células deficientes e proficientes na via NER.
- Discutir, através da elaboração de um artigo de revisão, o papel da via NER no reparo de lesões induzidas por inibidores da Topo II.

Capítulo I

INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR ON MITOXANTRONE CYTOTOXICITY

Artigo aceito para publicação na revista *DNA Repair*

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo será apresentado um manuscrito que demonstra os efeitos do antineoplásico mitoxantrona (MXT) em células proficientes ou deficientes em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), aceito para publicação na revista *DNA Repair*.

O manuscrito relata a elevada sensibilidade a MXT das células deficientes na via NER comparadas às células proficientes. Também são descritas algumas respostas celulares frente ao tratamento com MXT, como indução de danos ao DNA, perfil de ciclo celular e avaliação de algumas lesões induzidas por esta droga. Os resultados demonstraram que células deficientes em uma das subvias do NER (associada à transcrição – TCR – e de reparo global do genoma – GGR) apresentam respostas diferenciadas ao tratamento com MXT.

Por fim, é elaborado um modelo de como as lesões induzidas pela MXT podem ser reparadas, demonstrando que a via NER é importante para a sobrevivência das células em resposta ao tratamento com MXT e que a subvia TCR apresenta papel importante no processamento dos complexos Topo II-DNA.

Influence of Nucleotide Excision Repair on Mitoxantrone Cytotoxicity

Jaqueline Cesar Rocha^{1,2}, Franciele Faccio Busatto^{1,2}, Lisiane Knob de Souza¹, Jenifer Saffi^{1,2}*

¹ Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

² Post-Graduation Program in Molecular and Cellular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author. Adress: Laboratory of Genetic Toxicology; Rua Sarmiento Leite, 245, Anexo III, Bairro Centro, CEP 90050-170, Porto Alegre- RS, Brazil. Tel.: +55 51 33038861

Abstract

Mitoxantrone (MXT) is an anticancer drug structurally related to anthracyclines, such as doxorubicin (DOX). Here we report that cells deficient in nucleotide excision repair (NER) are very sensitive to MXT. However, cells deficient in each of the NER sub-pathways - transcription coupled repair (deficient in CSB protein) and global genome repair (deficient in XPC protein) - demonstrate a difference in sensitivity from each other and also show different responses in cell cycle profile, DNA synthesis and topo II DNA complex formation upon MXT treatment. XPC-deficient cells are slightly more resistant than CSB-deficient cells, and in the same way as MRC5 NER-proficient cells, show G2/M arrest, normal DNA synthesis rate and a pattern of formation of complexes similar to proficient cells, whereas CSB-deficient cells show accumulation in S phase, reduced DNA synthesis and a more intense signal of topo II DNA complexes, indicating that they remain longer in these cells. Complementation of CSB mutant cells with CSB rescue MXT-induced sensitivity and also a decrease in the signal intensity of the complexes, suggest that resolution of these lesions would take place. Taken together, our results indicate that NER proteins are implicated in the response to MXT and that CSB protein has a key role in processing MXT-induced topo II DNA complexes.

Keywords: Mitoxantrone; Topoisomerase II inhibitors; Nucleotide Excision Repair; CSB; XPC

1. Introduction

The main goal of cancer treatment is to eliminate tumor cells more efficiently than cells from normal tissues by exploring cellular and molecular features of the tumor. Mitoxantrone (MXT) is a synthetic antineoplastic drug structurally analogous to anthracyclines, such as doxorubicin (DOX). MXT has been used in the treatment of various cancers, including leukemia, non-Hodgkin lymphoma and breast cancer, since it presents equal cytotoxicity but reduced cardiotoxicity when compared to DOX [1, 2, 3].

MXT is included in the topoisomerase II (topo II) inhibitors class of drugs. When topo II unwinds and cleaves DNA, topo II inhibitors bind to the intermediate cleavable complex (topo II DNA) and inhibit the rejoining of the cleaved duplex. Generation of high levels of topo II DNA complexes have effects on cellular physiology, DNA replication progression and transcription. The processing of these complexes leads to the formation of single- and double-strand breaks (SSBs and DSBs), and cells subsequently undergo apoptosis [4]. MXT cytotoxicity is also due to its ability to generate adducts, inter-strand DNA crosslinks (ICLs), and reactive oxygen species (ROS) [5, 6, 7].

The effectiveness of cancer treatment can be influenced by DNA repair pathways that when up-regulated can cause resistance by removing DNA lesions before they become toxic; conversely, pathways that are lost can be exploited by selecting the appropriate chemotherapy to induce unreparable DNA damage [8]. It is not very clear which repair pathway is involved in the removal of lesions caused by topo II inhibitors. The removal of topo II DNA complexes may be achieved by action of Tdp2, a tyrosyl-DNA phosphodiesterase that processes topo II DNA complexes via direct reversal of the 5'-phosphotyrosyl linkage or also by proteasoma or nucleolytic removal of topo II

from DNA. Moreover, it is conceivable that these pathways function in coordination with recombinational repair pathways [9, 10]. As topoisomerase II inhibitors such as DOX and MXT are able to induce other lesions besides topo II DNA complexes, other mechanisms are expected to be involved in the response to these drugs. There is evidence that Nucleotide Excision Repair (NER) plays a role in this response. Studies from our group have shown that cell lines deficient in NER proteins XPA, XPC, XPD and XPV are more sensitive to DOX and its analogues than the wild-type cells, indicating a role of NER in the repair of lesions induced by anthracyclines [11, 12, 13]. In addition, XPD-deficient cells silenced in topo II are more sensitive to DOX than NER-proficient cells, indicating that besides lesions resulting from topo II inhibition, there are other lesions induced by DOX that require functional NER for their resolution [11].

NER is involved in the removal of lesions that lead to significant structural distortions in the DNA chain, namely pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts, adducts generated from photo-activated psoralens, cisplatin, alkylating agents, inter-strand crosslinks and other lesions [14, 15]. Deficiencies in human NER underpin hereditary diseases such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and Trichothiodystrophy (TTD) [16, 17]. In terms of lesion recognition, NER is divided in two sub-pathways: Transcription Coupled Repair (TCR) and Global Genome Repair (GGR). TCR includes proteins such as CSB and CSA, which recognize lesions that induce the arrest of RNA polymerase in the transcription process, while GGR includes proteins such as XPC and XPE, which recognize DNA damage related to the whole genome. After DNA damage recognition, the DNA helix is opened by XPB and XPD helicases of the repair and transcription factor IIIH (TFIIH), allowing damage verification by the XPA protein. Excision of the damaged strand is accomplished by the

ERCC1-XPF and XPG endonucleases. The single-strand gap is then filled by the replication machinery, and the final nick is sealed by DNA ligase [14, 15, 16, 17, 18].

Due to similarities in the structure and action mechanism between DOX and MXT, this work aims to evaluate the DNA damage response of NER-proficient and deficient cell lines to treatment with MXT, in an attempt to elucidate the mechanisms involved in the repair of lesions induced by this topo II inhibitor that may influence the chemotherapy response.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatment

The cells used were SV40-transformed fibroblasts isolated from skin biopsies of patients with deficiencies in some NER proteins, such as XPD (XP6BE-SV), XPA (XP12RO-SV), CSB (CS1AN-SV) and XPC (XP4PA-SV). SV40-transformed MRC5 human fibroblasts, proficient for DNA repair, were used as controls. These cells were kindly provided by Dr. A. Sarasin (Institut Gustave Roussy, France). CSB mutant cell line (CS1AN-SV) stably expressing CSB or empty vector-transfected controls were provided by Dr. C. F. M. Menck (USP, Brazil). Cells were routinely grown at 37 °C, in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (Invitrogen). The cells were monitored periodically to ensure that they were mycoplasma-free. For treatment, cells were seeded in an appropriate number 24 h prior to treatment and exposed to different concentrations of MXT (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 µg/mL) or Etoposide (0.5, 1.0 and 2.5 µM) for 2, 24 or 48 h. The drugs were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Cell viability and determination of death mechanism

For the cytotoxicity assay, after each treatment, cells were rinsed with PBS and incubated for 72 h in a drug-free medium. Cell viability was assessed using Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Switzerland). Briefly, 50 μ L of XTT labeling mixture were added to the cells and incubated for 3 h at 37 °C. Absorbance was measured at 492 and 690 nm, and the final result corresponds to A492-A690. The cell viability was also evaluated by Trypan blue staining in XPC and CSB cells in order to obtain more reliable results. After treatment, the cells were counted by Trypan blue staining using a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen).

For determination of death mechanism, adherent and detached cells were incubated with a solution containing Annexin V and 7-AAD (7-Amino-Actinomycin) (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I – BD Pharmigen). Annexin V is a calcium-dependent phospholipid-binding protein that has a high affinity for phosphatidylserine (PS), which is exposed in cells undergoing apoptosis, while 7-AAD is a standard flow cytometry probe used to distinguish viable and nonviable cells. Viable cells (V) are negative for both Annexin-V and 7-AAD; cells that are in early apoptosis are positive only for Annexin-V and cells that are in late apoptosis (LA) are both Annexin-V and 7-AAD positive, while cells that are in necrosis (N) are 7-AAD positive. Cells were incubated for 15 minutes at room temperature (RT) in the dark. Data were collected with a FACSCalibur flow cytometer (BD) and analyzed with Cell Quest software (BD),

2.3. Comet assay and repair of damage

For the DNA damage evaluation, cells were exposed to MXT for 2 h and subjected to single cell electrophoresis (Comet assay) under alkaline conditions as described by Singh *et al.* [19]. Briefly, 20 μ L of cell suspension (~10,000 cells) treated as described above, were mixed with 90 μ L low melting point agarose, spread on a normal pre-coated microscope slide and placed at 4 °C for 5 min to allow solidification. Cells were lysed in high salt and detergent (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris with 1% Triton-X-100 and freshly added 10% DMSO) during 2 h. Subsequently, cells were exposed to alkali (300 mM NaOH/1 mM Na₂EDTA, pH>13, 30 min, 4 °C) to allow DNA unwinding and production of alkali-labile sites. For electrophoresis, an electric field of 78 V/cm was applied for 25 min at 4 °C. After electrophoresis, the slides were neutralized, stained with silver nitrate, and analyzed using an optical microscope. One hundred cells were scored visually according to the tail length and amount of DNA present in the tail. Each comet was given an arbitrary value of 0-4 (0, undamaged; 4, maximally damage), as described by Collins [20]. A damage score was thus assigned to each sample and ranging from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4). To evaluate the ability to repair the DNA damage, after 2 h treatment, cells were incubated in drug-free medium and subjected to analysis 24 h post-treatment as described above.

2.4 Immunofluorescence detection of γ -H2AX

For γ -H2AX immunostaining, after treatment, cells were fixed (4% paraformaldehyde) for 10 min at RT, permeabilized (0.1% Triton-X100 in PBS) for 5 min at RT, blocked (3% FBS in PBS) for 15 min at RT and incubated with the anti- γ -H2AX antibody (Alexa-Fluor 488 Mouse anti-H2AX (pS139) from BD Biosciences) diluted 1:50 for 1 h at RT. Cellular fluorescence was measured by flow cytometry. Results are presented as the ratio of fluorescence between treated and untreated cells.

2.5 Cell cycle and DNA synthesis analysis

For cell cycle analyses, after treatment adherent and detached cells were fixed with chilled 80% ethanol for at least 24 h at -20°C . After removing ethanol, cells were permeabilized (0.1% TritonX-100 in PBS), stained at 37°C for 30 min in PBS containing 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propidium Iodide and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase, and analyzed by flow cytometry. For DNA synthesis analyses, cells were treated with MXT for 2 h and after a recovery in drug free medium for 24 h cells were pulse-labeled with 10 μM bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich) for 1 h before FACS analysis, where the percentage of BrdU incorporating cells was determined. The protocol used anti-BrdU-PE antibody (BD Biosciences).

2.6. Measurement of intracellular ROS

Cells were treated with MXT for 2 h and ROS production was immediately measured, as well as after 24 and 48 h of MXT treatment. After washing with PBS, cells were stained with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate DCFH-DA (10 μM) for 30 min at 37°C and analyzed by flow cytometry. The results are expressed as a ratio to the

negative control, where ROS production was set as 1. Cell treatment with 1 mM H₂O₂ for 30 min was used as positive control.

2.7. Formation of topo II DNA complexes

The TARDIS (trapped in agarose-DNA immunostaining) assay was used to measure the stabilization of the topo II DNA complexes, according to Wilmore et al [21]. Topoisomerase II enzyme, covalently bound to nuclear DNA due to its interaction with topo II-targeting poisons, was detected using anti-topoisomerase II α antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1:200, and Alexa-Fluor 555-labeled secondary antibody (Cell Signaling). Images of blue (DAPI-stained DNA) and red (Alexa-Fluor 555-stained drug-stabilized topo II) fluorescence were captured with a fluorescence microscope OLYMPUS BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and the areas occupied by the blue and red fluorescence were quantified with ImageJ software (NIH, Maryland, USA). To measure the capacity for removal of topo II DNA complexes, after treatment, the cells were grown in drug-free medium for additional 24 h and the topo II DNA complex formation was assessed as described above. Approximately one hundred cells were analyzed for each experimental condition.

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software, version 5.0 (Cherwell Scientific, Oxford, UK). Results are the mean of three independent experiments with error bars showing the standard error. Statistical analysis was

performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. An alpha level of 0.05 was used to determine significance in all statistical analyses.

3. Results

3.1. NER-deficient cells have higher sensitivity to MXT

In order to define MXT-induced cytotoxicity in cells proficient (MRC5) or deficient (XPD, XPA, CSB and XPC) in DNA repair, cell viability and cell death induced by this drug were determined. All NER-deficient cell lines presented higher sensitivity to the MXT-treatment compared to the repair proficient MRC5 cell line at all tested times and doses. We observed that NER-deficient cells are very sensitive after short (Fig. 1A) and longer periods of treatment (Fig. 1B and C). In order to obtain more accurate and sensitive results, the viability of cells deficient only in either TCR (CSB cells) or GGR (XPC cells) to MXT treatment was also evaluated by using Trypan blue staining. The results showed that CSB cells are more sensitive to MXT compared to XPC cells (Fig. 1D). Considering that MXT causes other lesions besides the topo II DNA complexes, we analyzed the response to Etoposide, a drug that is known to cause mainly formation of topo II DNA covalent complexes [10]. Results of cell viability showed that NER-deficient cells have a different sensitivity profile and that CSB cells were more sensitive to Etoposide than proficient cells and XPC cells (Fig. 1E). The differences observed in response to MXT and Etoposide indicate that lesions induced by topoisomerase II inhibitors can be differently recognized by TCR and GGR sub-pathways.

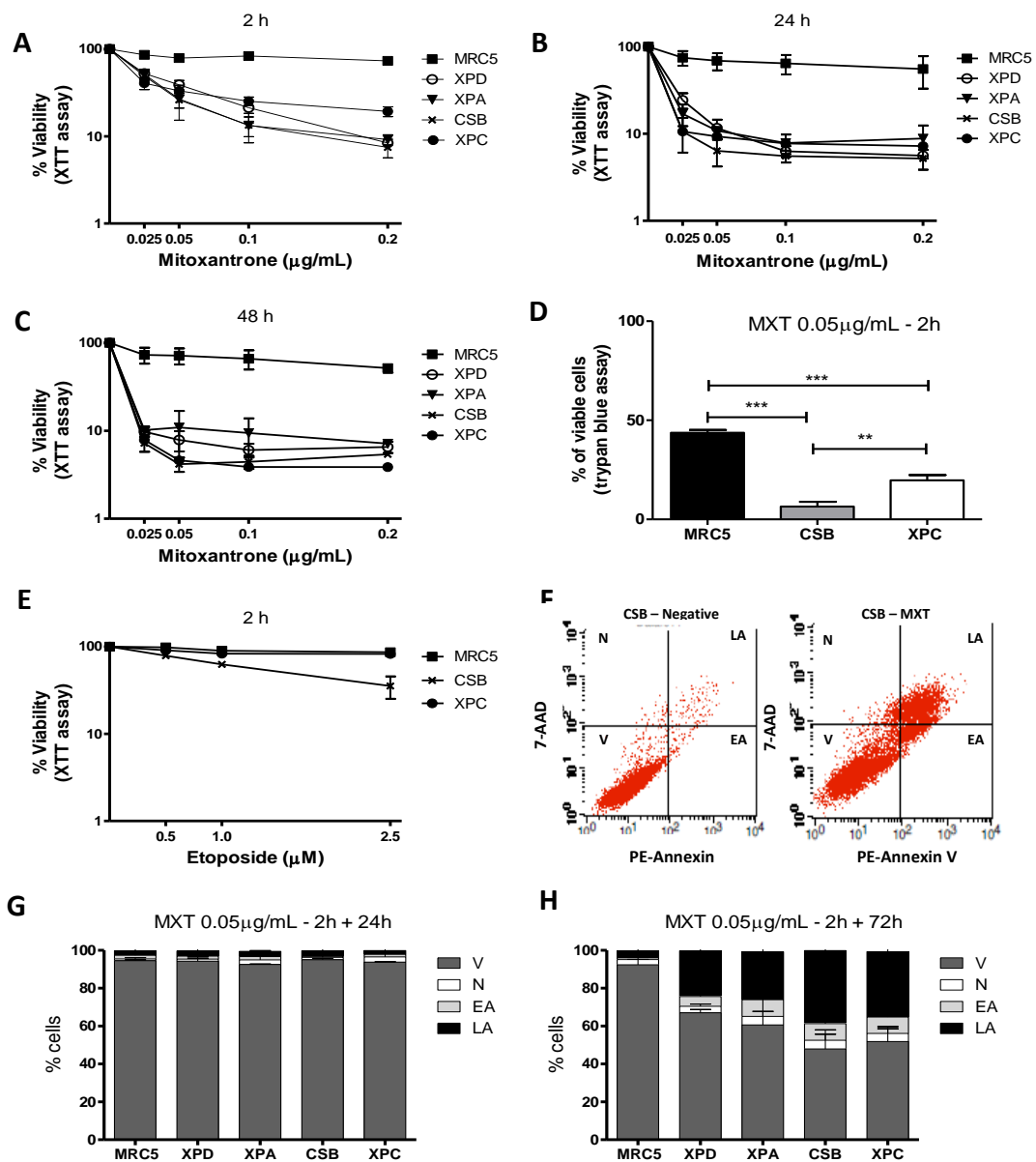


Figure 1. **NER-deficient cells have higher sensitivity to MXT.** (A, B and C) Cells were treated with MXT for the indicated doses and times, and cell viability was assessed 72 h later by XTT assay. Significantly different $p < 0.0001$ for MRC5 versus all deficient cells (all doses and times). (D) Cells were treated with MXT $0.05 \mu\text{g/mL}$ for 2 h and cell viability was assessed 72 h later by Trypan blue staining. $p < 0.001$ for MRC5 versus CSB and XPC and $p < 0.01$ for XPC versus CSB. (E) Cells were treated with indicated doses of Etoposide for 2 h and cell viability assessed 72 h later by XTT assay. $p < 0.01$ for CSB versus MRC5 and XPC (all doses) (F) Representative histograms showing cell distribution between compartments in FACS analysis using Annexin-V and 7-AAD, indicating viable cells (V), early apoptosis (EA), late apoptosis (LA) or

necrosis (N). Cells were treated with MXT 0.05 μ g/mL for 2 h and analyzed 24 (G) or 72 (H) h later for death mechanism, by flow cytometry. Significantly different $p < 0.0001$ for MRC5 versus XPA, CSB and XPC, for viable and late apoptosis. $p < 0.01$ for MRC5 versus XPD for viable and late apoptosis.

To confirm whether this decrease in viability of NER-deficient cells was related to increased apoptosis, the Annexin V assay was performed. Figure 1F demonstrates a representative histogram analysis of CSB cells, in which the compartments indicate viable cells (V), cells in early apoptosis (EA), late apoptosis (LA) or necrosis (N). Interestingly, when cell death was assessed 24 h after treatment, no differences were observed among cell lines (Fig. 1G). Only when this time was extended to 72 h after MXT treatment we observed cell death increase in all NER-deficient cells, which is mainly via apoptosis (Fig. 1H).

3.2. MXT induces DNA damage in a dose-dependent manner

DNA damage induction was assessed by comet assay. MXT treatment induced significant increase of DNA damage, in relation to untreated cells in all cell lines, in a dose-dependent manner (Fig. 2A). To check if the repair of the damage was occurring, the damage index was assessed 24 h after growing cells in a drug-free medium. The results indicate that the lesions are repaired in a similar manner and no differences were observed among NER-deficient and proficient cell lines in the first 24 h after treatment (Fig. 2B). The induction of DNA damage was also analyzed through the phosphorylation of histone H2AX, a sensitive marker of DNA damage response [28]. MXT treatment led to increased induction of γ -H2AX in all cell lines after 2 h of treatment (Fig. 2C); however, no significant differences were detected among the cell

lines. After a recovery in drug-free medium for 24 h, the cells showed a more pronounced induction of γ -H2AX (Fig. 2D). Interestingly, although no differences were observed after this period of recovery when deficient cells were compared to proficient cells, a little, but significant difference was observed between the deficient cells CSB and XPC ($p<0.05$), reinforcing the idea that MXT-induced lesions are differently processed by NER sub-pathways.

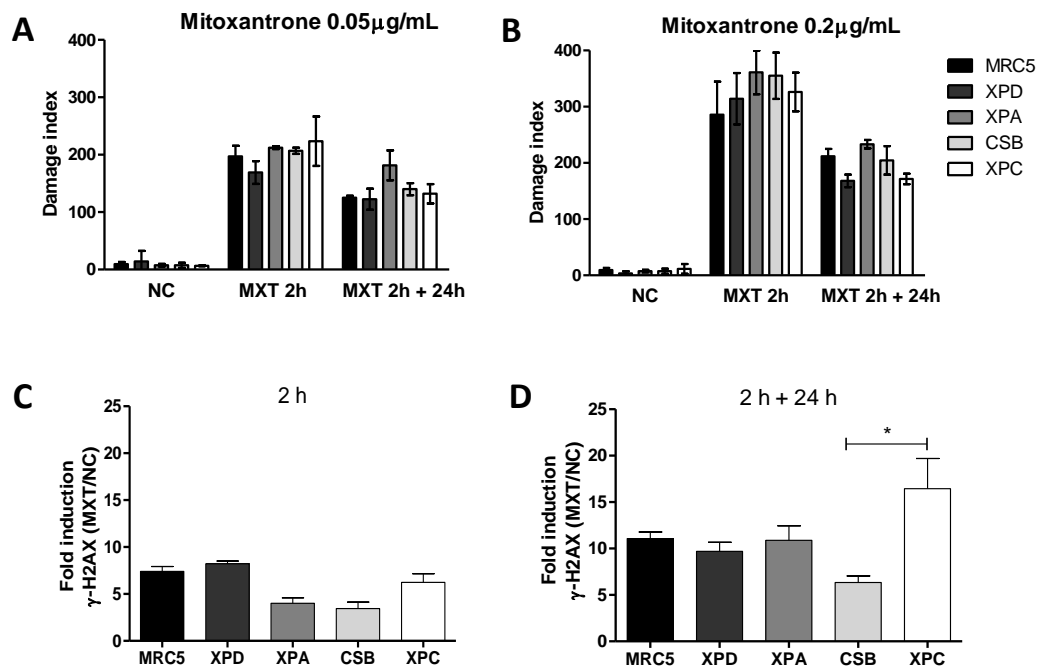


Figure 2. **MXT induces DNA damage in a dose-dependent manner.** Cells were treated for 2 hours with different doses of MXT and DNA damage index was measured by Comet assay both immediately (A) and 24 hours after treatment (B). Cells were treated with MXT 0.05 μ g/mL for 2 hours and γ -H2AX formation was analyzed by flow cytometry both immediately (C) and 24 hours after treatment (D). Untreated cells were used as negative control (NC). * $p<0.05$

3.3. NER-deficient cells have different cell cycle and DNA synthesis profiles

MXT treatment induced an increase in cells in S and G2/M phases of cell cycle [22]. When the cell cycle profile was evaluated in response to a continuous treatment with MXT, differences in patterns of cell accumulation were observed among the cell lines. MRC5 (proficient), and XPC (deficient in GGR), showed an increase in proportion of cells in the G2/M phases. On the other hand, CSB cells (deficient in TCR), as well as XPA and XPD (deficient in GGR and TCR) accumulated more cells in S phase (Fig. 3A). The increase in sub-G1 cells was once more an indication of higher sensitivity of NER-deficient cells to MXT treatment.

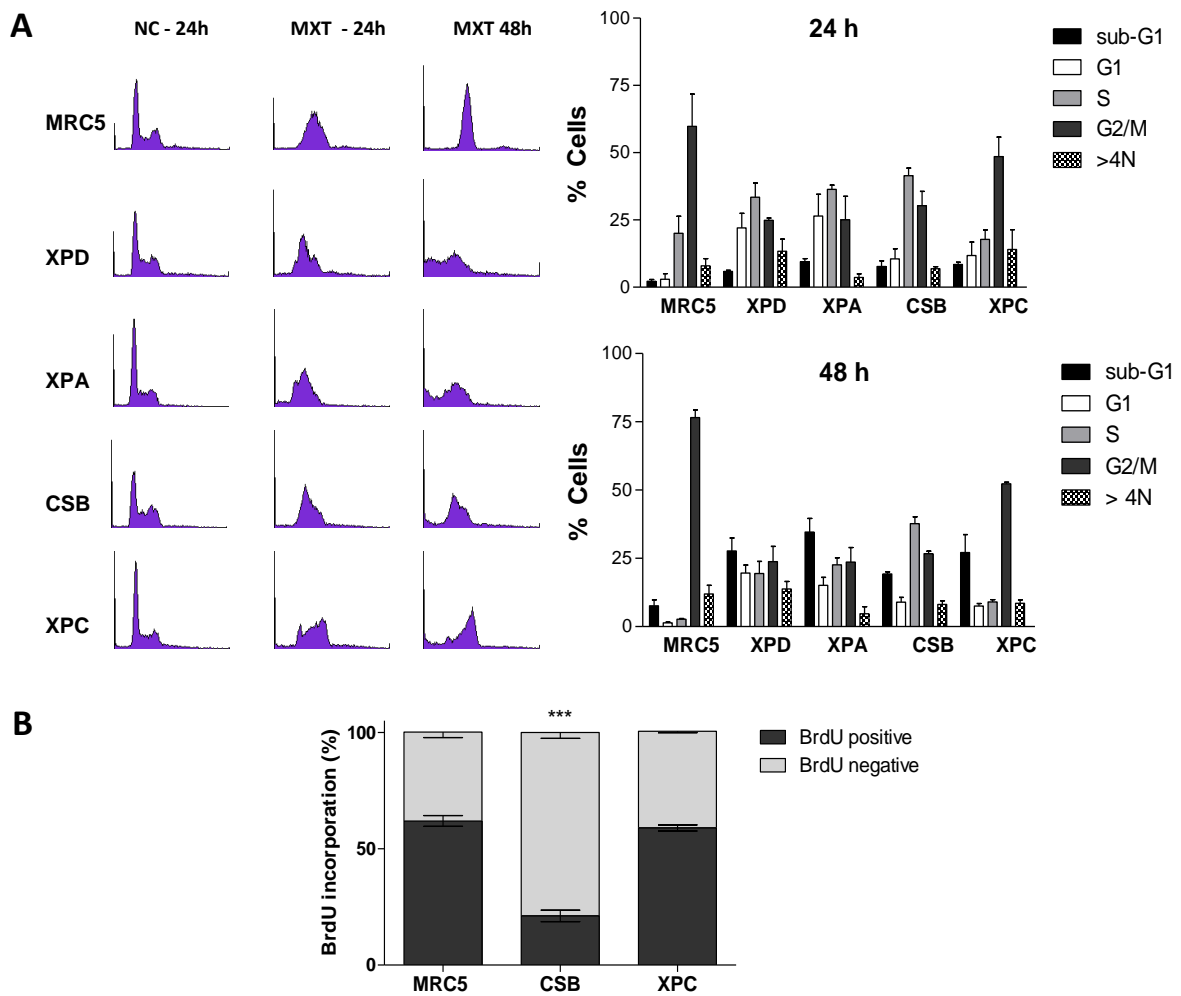


Figure 3. NER-deficient cells have a different cell cycle and DNA synthesis profiles.

(A) Cells were treated with MXT 0.05 μ g/mL for 24 or 48 h and cell cycle profile was analyzed by flow cytometry. Untreated cells were used as negative control (NC). (B)

Cells were treated with MXT 0.05 μ g/mL for 2 h and the rate of DNA synthesis was assessed 24 h later by flow cytometry using a BrdU assay. *** p <0.0001

Because there were significant differences in cell viability between CSB and XPC following short MXT exposure (2 h), together with the fact that this drug induces a blockage of DNA synthesis [4], a BrdU assay was performed in order to verify the DNA synthesis after recovering the cells from the treatment. When cells were exposed to MXT for 2 h and maintained in drug-free medium for an additional 24 h, CSB cells presented a decrease in DNA synthesis, compared with MRC5 and XPC (Fig. 3B).

These results led us to further investigate the role of CSB and XPC proteins in the response to MXT, since they belong to different NER sub-pathways.

3.4. NER proficient and deficient cells present no ROS formation after MXT treatment

Given that ROS formation is regarded as one of the MXT toxicity mechanisms [6] and that CSB cells are very sensitive to oxidative stress [23, 24], we evaluated ROS levels by using a specific marker (DCFH-DA) after 2 h MXT treatment, and 24 and 48 h post-treatment. There was no ROS formation in the doses and times of tested treatments, indicating that they are not responsible for the different responses between XPC and CSB cells after MXT exposure (Fig. 4). ROS levels were not analyzed after 72 h, because a significant cell death of NER-deficient cells was already observed 48 h after treatment, especially in CSB (data not shown).

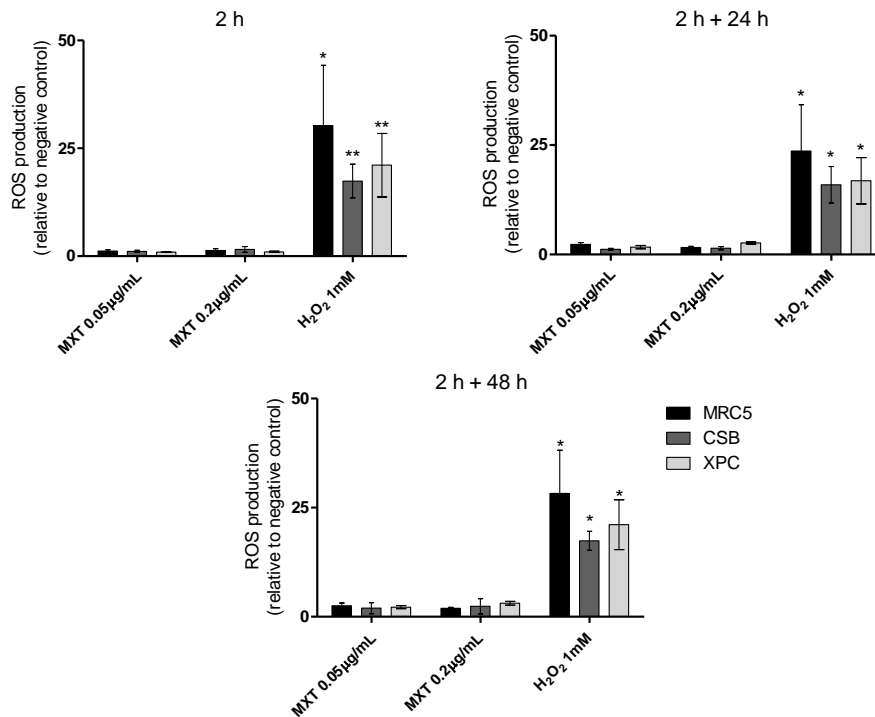


Figure 4. **NER proficient and deficient cells present no ROS formation after MXT treatment.** Cells were treated with MXT 0.05 or 0.2 µg/mL for 2 hours and ROS production was analyzed by flow cytometry using DCF-DA both immediately and 24 or 48 h after grown in drug-free medium. H₂O₂ 1 mM for 30 min was used as positive control. Untreated cells were used as negative control and ROS production in these cells was set as 1. Results are expressed as ratio between treated and untreated cells. * $p < 0.05$ for H₂O₂ versus MXT treatment.

3.5. CSB cells have a more intense signal for topo II DNA complex formation

Considering that the main action mechanism of MXT is topo II inhibition, we decided to analyze the formation and repair of complexes in NER-deficient and proficient cells, using the TARDIS assay [21]. The treatment with different doses of

MXT for 2 h induced the formation of complexes in MRC5 cells in a dose-dependent manner (Fig. 5A). Comparing NER-deficient and proficient cells, we observed that CSB cells presented a more intense signal for topo II DNA complex formation, whereas XPC presented a less intense signal, similar to those found in MRC5 (Fig. 5B and C). This result suggests that in CSB cells the complexes are more stable and remain longer in the cell. To determine whether there were any differences in the complexes removal, their formation was assessed 24 h after being grown in drug-free medium. The signal intensity was reduced compared to the point immediately after treatment in all cell lines (Fig. 5B and D). However, CSB cells yet again showed a more intense signal compared to MRC5 and XPC, indicating that CSB protein may have a role in the removal of complexes.

3.6. Complementation with CSB protein protects against the effects of MXT in CSB-deficient cells

To verify whether the presence of the wild-type protein CSB has an effect in protecting CSB-deficient cells against MXT treatment, CSB complemented cells were used in the following experiments. Results of a viability assay show that CSB cells complemented with wild-type protein are more resistant to MXT effects than cells with an empty vector (Fig 6A). We also evaluated the formation of topo II DNA complexes in these complemented cells and found that in the presence of wild-type protein the signal intensity of complexes also decreased (Fig 6B), similarly to what was observed in proficient cells. When the complexes were evaluated 24 h after treatment, we once more observed that the signal was more intense in cells with the empty vector (Fig 6C),

confirming the hypothesis that CSB protein is involved in the processing of topo II DNA complexes.

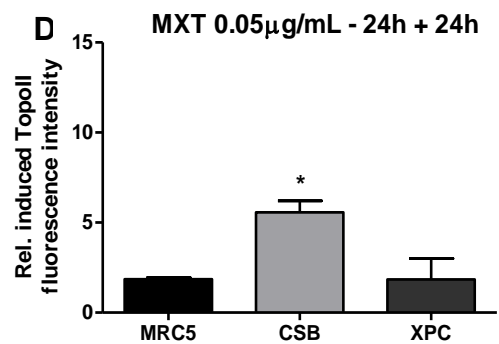
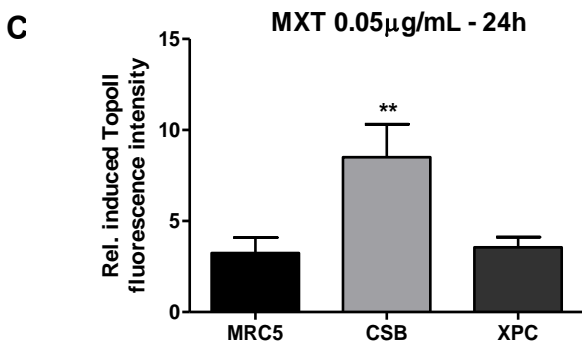
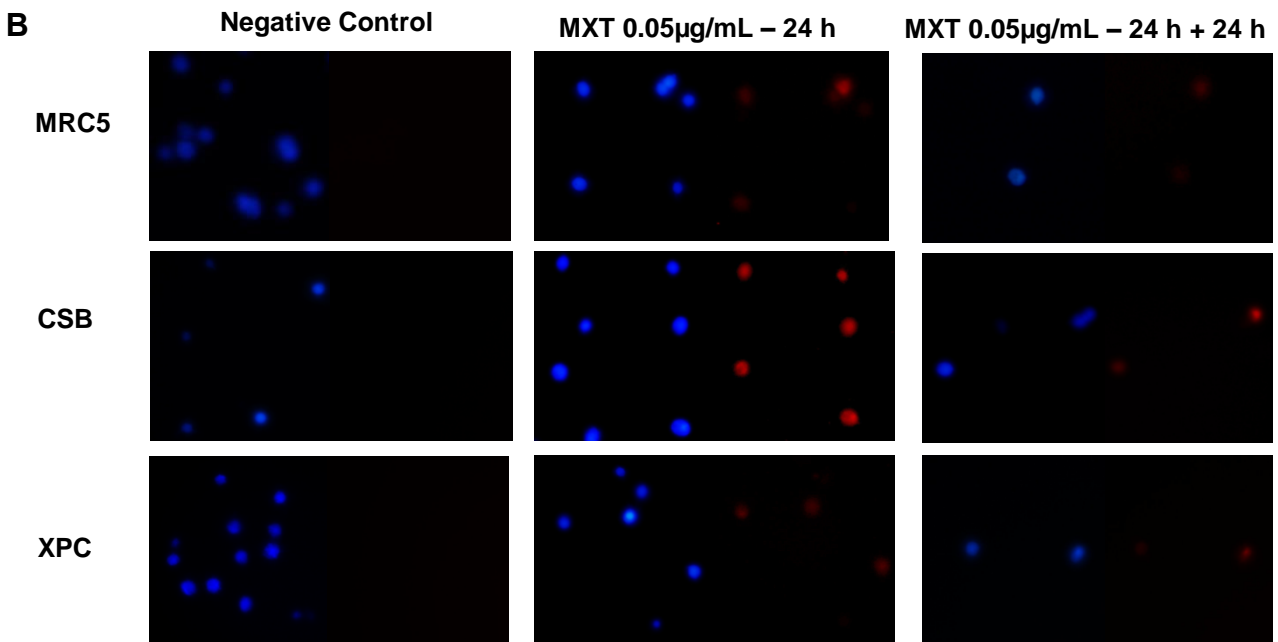
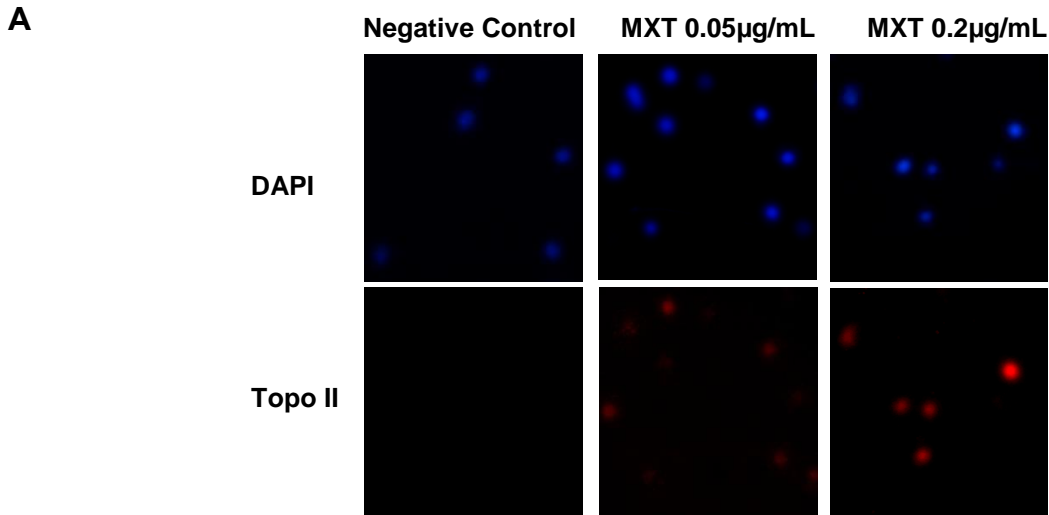


Figure 5. **CSB cells have a more intense signal for Topo II-DNA complexes formation.** Cells were treated with different doses of MXT for different times and Topo II-DNA complexes formation was analyzed by TARDIS assay [21]. Untreated cells were used as negative control (NC). (A) Images of MRC5 cells treated with MXT 0.05 or 0.2 μ g/mL for 2 h. (B, C and D) MRC5, CSB and XPC cells were treated with MXT 0.05 μ g/mL for 24 h or additional 24 h in drug-free medium. (B) Images on the left show the DAPI-stained DNA (blue) whereas those on the right show corresponding Alexa-555-stained Topo II (red). Quantification of fluorescence intensity of complexes in cells immediately (C) and 24 h after treatment (D), showing results of approximately one hundred cells for each condition. ** p <0.01; * p <0.05

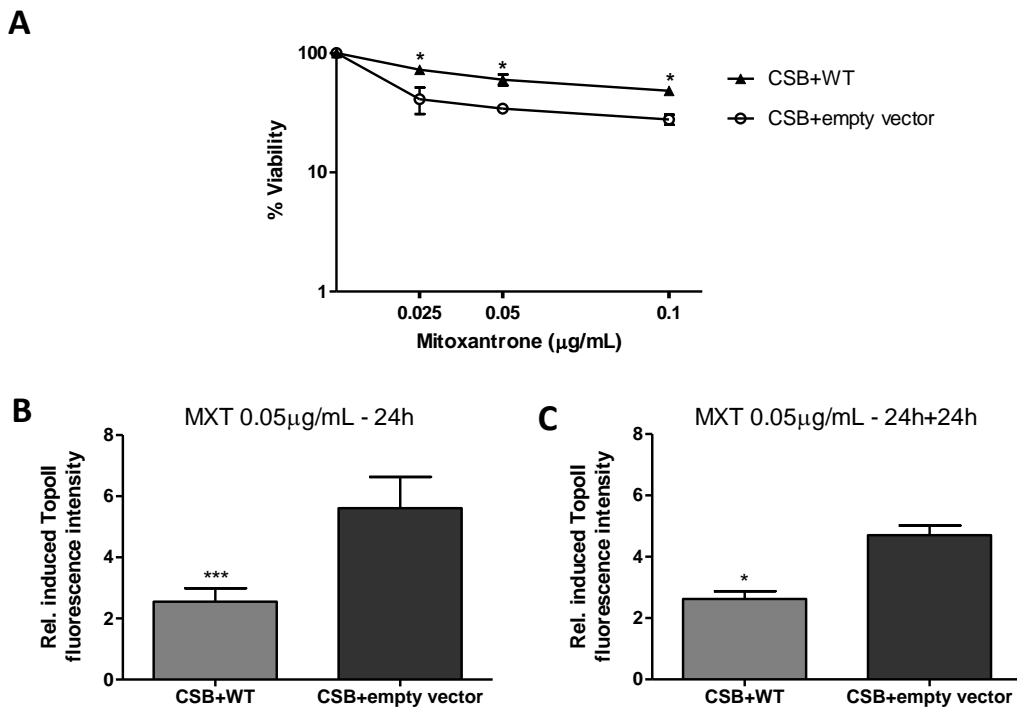


Figure 6. **Complementation with CSB protein protects against the effects of MXT in CSB-deficient cells.** (A) CSB cells complemented with WT protein or with empty vector were treated with MXT at indicated doses for 2 h, and cell viability was assessed 72 h later by XTT assay. (B and C) Complemented cells were treated with MXT

0.05 μ g/mL for 24 h and Topo II-DNA complexes formation was analyzed by TARDIS assay immediately (B) or 24 h after treatment (C). *** p <0.001; * p <0.05

4. Discussion

MXT is a drug from the class of topoisomerase II inhibitors, analogous to anthracyclines, such as DOX. Its mechanism of action is based mainly in the formation of topo II DNA complexes; however, MXT induces other lesions such as DNA adducts, inter-strand crosslinks, and damage induced by free radical formation [1, 5, 6, 7]. NER is classically known for its activity on DNA damage caused by UV radiation; however, up to this moment, little is known about the response of NER-deficient cell lines to antitumor drugs like MXT. Studies from our group have indicated a higher sensitivity to DOX in XPD-deficient cells [11] and XPA-deficient cells [12] compared to proficient cells. In our study with MXT, the sensitivity of NER-deficient cell lines was higher than that of MRC5 cells at all times of treatment and even in the lowest doses of MXT, reinforcing the idea that drugs such as DOX and analogues such as MXT induce lesions that require the NER pathway to be processed. In addition, the highest sensitivity of CSB compared to XPC cells to both MXT and etoposide indicates that there are differences between the NER sub-pathways in the processing of lesions induced by topo II inhibitors.

Previous studies using neutral comet assay indicate that treatment with MXT significantly increases DNA damage [26]. Using the alkaline version of comet assay, we demonstrated a similar damage induction after a 2 h MXT treatment between NER-deficient and proficient cells and although some repair of damage occurs and the damage decreases in all cell lines after 24 h of drug removal, it does not return to the basal levels. Therefore, probably the remaining lesions in NER-deficient cells can be

responsible for their low viability 72 h after treatment. Treatment with MXT induces activation and phosphorylation of ATM and H2AX in all phases of the cell cycle; however, the highest level of H2AX phosphorylation in cells through the G1 phase leads to the hypothesis that the DSB's generated by this drug are largely due to collisions of RNA polymerase with the topo II DNA complexes [7, 22, 27]. H2AX is a marker of DNA damage and can be phosphorylated by ATR in response to SSBs or during replication stress [28]. Moreover, repair of lesions such as DNA adducts involves the NER mechanism, known to generate single strand breaks that would be contributing to increase in γ -H2AX [29, 30]. In our analyses, a more intense induction of γ -H2AX 24 h after treatment indicates that lesions are still being processed at this point and, in the case of NER-deficient cells, inducing more damage. Considering that at this time the majority of cells remain viable, as observed in the apoptosis assay, the lesions had to be processed to induce cell death 72 h after treatment. Our results confirm this slowest action of MXT, as demonstrated in studies showing that apoptosis is dependent on DNA fragmentation that occurs only 36 h after the treatment with MXT, and irrespective of its concentration, any apoptotic changes occur within 48 h [31].

MXT interferes with the cell cycle progression, and cellular damage induced by this drug leads to activation of several proteins involved in cell cycle arrest, with an increase of cells in S and G2/M phases [22, 32, 33]. In response to MXT treatment, XPC cells accumulate more cells in G2/M phases such as MRC5, while CSB cells present an accumulation of cells in S phase, as well as XPD and XPA, indicating that MXT-induced lesions trigger different responses in NER-deficient cells. MXT and other topo II inhibitors cause an effective blockage of RNA and DNA synthesis [4]. The DNA synthesis decrease in CSB cells 24 h after recovery in drug-free medium reinforces the idea that part of these lesions induced by MXT is differently recognized by the TCR

sub-pathway. Our hypothesis is that CSB cells are unable to recognize and repair these lesions, causing a delay in the G1/S phase progression and a decrease in the rate of DNA synthesis. Thus, we decided to investigate which lesions could be responsible for the different responses between XPC and CSB cells.

Some data in the literature suggest that the cytotoxic effects of DOX and MXT involve ROS generation, although MXT is known to have a reduced potential to induce oxidative stress compared to DOX [34, 35]. In addition, upon oxidative stress CSB cells show increased cytotoxicity and accumulate oxidative DNA damage [23]. In our results, we were unable to detect significant changes in overall ROS levels, when measured immediately and either 24 or 48 h after MXT treatment. Huang et al [7] suggest that MXT toxicity is partly caused by ROS production; although they were not able to detect ROS production using carboxy-H₂DCFDA. Another study demonstrated the ROS involvement in the action of MXT, however using much higher MXT doses than we used in our experiments [36]. These data lead us to conclude that the tested doses of MXT were not able to induce ROS and therefore they are not responsible for the different responses observed among NER-deficient cells.

The topo II DNA complexes are important lesions induced by topoisomerase II inhibitors, and the stabilization of topo II by MXT has been demonstrated for low doses and short times of treatment with MXT, with dissociation of most of the complexes occurring within 24 h after treatment [26, 37]. Our results demonstrating that CSB cells have a more intense signal in the first 24 h of MXT treatment indicate that in these cells the removal of complexes is impaired, while in MRC5 and XPC cells they have begun to be broken, since differences can be observed in signal intensity among the cells. Furthermore, MXT-induced complexes decrease to even lower levels in MRC5 and XPC cells 24 h after treatment. The participation of CSB protein in removal of

complexes can be suggested again, since in these cells the signal remains more intense. In response to camptothecin (CPT), a topoisomerase I inhibitor, a truncated form of CSB protein inhibits the repair of topo I DNA complexes and the presence of wild-type CSB reverses this effect [38]. Also in response to CPT, knockdown of CSB slowed the kinetics of 53BP1 foci formation, revealing that CSB is one of the factors that influences the response to transcription-mediated DNA strand breaks [39]. In response to topo II DNA complexes, ubiquitination of topo II is necessary for its degradation by proteasome, followed by removal of 5'- phosphotyrosyl linkage by TDP2 and subsequent repair by recombinational pathways [40, 41, 42]. Furthermore, CSB cells are deficient in ubiquitination of proteins like RNA polymerase and p53, which is necessary to a proper response to DNA damage induced by UV radiation or cisplatin [43, 44]. The differences observed in CSB compared to MRC5 and XPC cells and the fact that the complementation of CSB-function abolished the sensitivity to MXT and decreased the intensity of complexes may indicate the participation of CSB protein in processing of topo II DNA complexes. This idea is reinforced by our results obtained with etoposide (and also MXT), which indicate a more pronounced sensitivity of CSB cells compared to XPC cells. In addition to topo II DNA complex formation, we still cannot exclude the possibility that DNA adducts induced by MXT may be responsible for the high sensitivities observed in all NER-deficient cell lines compared to proficient cells.

These results led us to propose a model of how different MXT-induced lesions are repaired. In this model (Fig. 7), after treatment with MXT, induction of lesions such as DNA adducts can be repaired by TCR and GGR-NER pathways. In response to topo II DNA complexes, the resulting blockade of the RNA-polymerase needs CSB protein to process the damage. To complement this model, further studies are needed to better understand the role of NER in removing lesions induced by MXT and other

topoisomerase II inhibitors. These results could be of great importance to clinical practice in the future, where the repair capacity of each patient can be assessed for a better choice of the therapeutic scheme and also be applied to the development of new treatment strategies based on DNA repair genes as molecular targets for intervention.

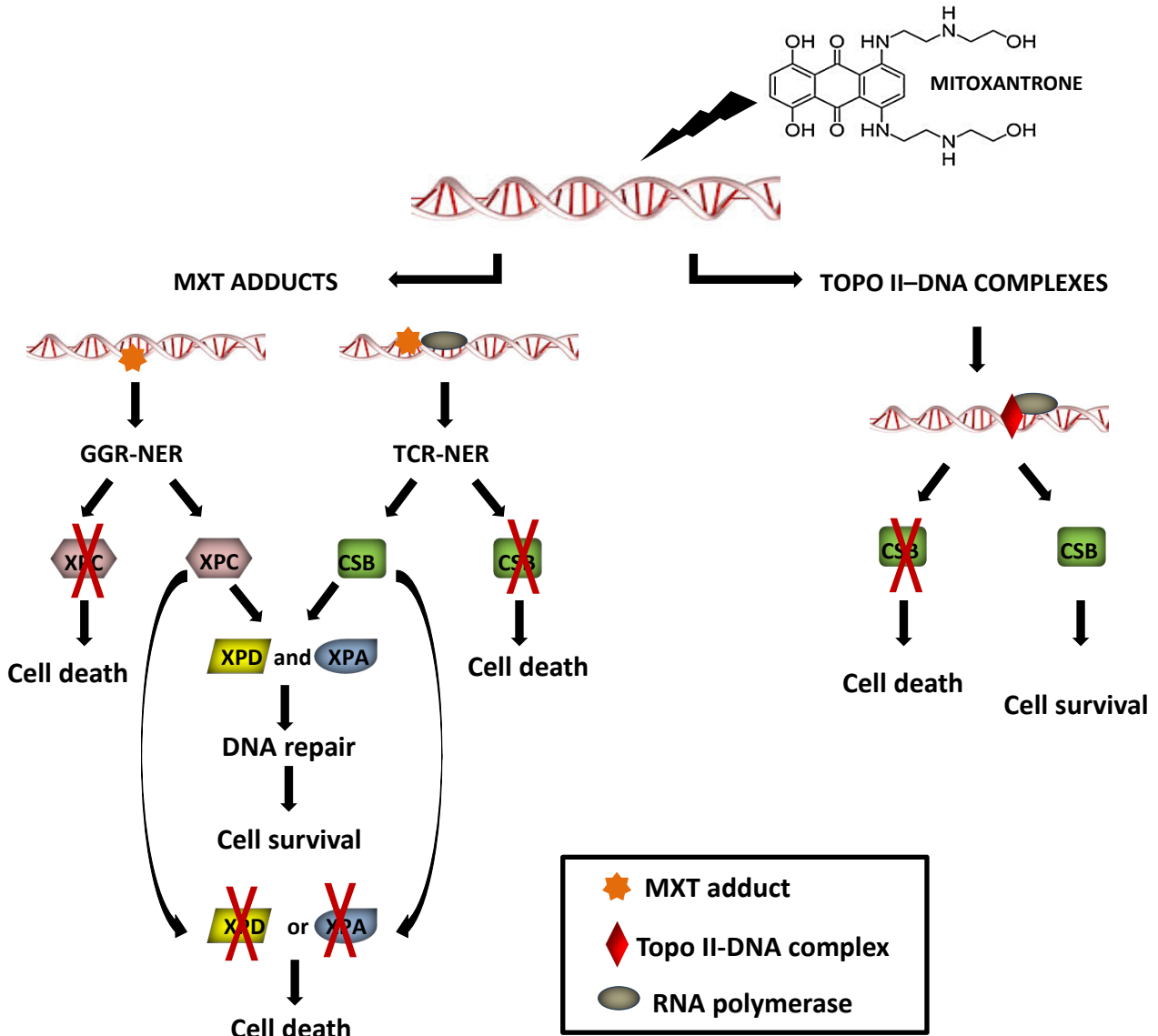


Figure 7. **Proposed model for participation of NER proteins in response to DNA damage induced by MXT.** After treatment with MXT, lesions such as DNA adducts and Topo II-DNA complexes can be formed. In response to DNA adducts the absence of XPC and CSB activity can lead to cell death, since the NER sub pathways cannot be fully activated. After lesion recognition, XPA and XPD are involved in the sequential

steps in DNA repair, promoting cell survival. In the absence of XPD or XPA, adducts cannot be repaired, inducing cell death. On the other hand, in response to Topo II-DNA complexes, the absence of CSB activity induces cell death. However, in the presence of CSB, damage can be recognized and repair can be completed, thus leading to cell survival.

Acknowledgements

This research was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil - Grant No. 12/1926-9), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil – Grant No. 479564/2013-2), PRONEX - FAPERGS/CNPq (Grant No. 10/0044-3) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil). JC Rocha received a doctoral fellowship from CAPES. We are grateful to Dr. Alain Sarasin (IGR, Villejuif, France) and Dr. Carlos F. M. Menck (ICB, USP, Brazil) for the cell lines used in this study.

References

- [1] Au WW, Butler MA, Matney TS, Loo TL. Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. *Cancer Res.*1981; 41: 376-379.
- [2] Faulds D, Balfour JA, Chrisp P, Langtry HD. Mitoxantrone: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs.* 1991; 41: 400-449.
- [3] Chugun A, Uchide T, Tsurimaki C, Nagasawa H, Sasaki T, Ueno, S, et al., Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated guinea-pig heart preparations. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 255-264.

- [4] Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(5): 338-350.
- [5] Parker BS, Buley T, Evison BJ, Cutts SM, Neumann GM, Iskander MN, Phillips DR. A molecular understanding of mitoxantrone-DNA adducts formation. *J Biol Chem*. 2004; 279(18): 18814–18823.
- [6] Skladanowski A, Konopa J. Mitoxantrone and amemantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. *Br J Cancer*. 2000; 82: 1300-1304.
- [7] Huang X, Kurose A, Tanaka T, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z. Activation of ATM and histone H2AX phosphorylation induced by mitoxantrone but not by topotecan is prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5: 959-964.
- [8] Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 801-817.
- [9] Schellenberg MJ, Appel CD, Adhikari S, Robertson PD, Ramsden DA, Williams RS. Mechanism of 5' topoisomerase II DNA adduct repair by mammalian tyrosyl DNA phosphodiesterase 2. *Nat Struct Mol Biol*. 2012; 19: 1363–1371.
- [10] Pommier Y. Drugging Topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*. 2013; 18: 82–95.
- [11] Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LFZ, Carvalho H, Henriques JAP, Stry A, Menck CF, Sarasin A. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XP-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010; 9: 40-47.
- [12] Moraes MC, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JAP, Sarasin A, Stry A, Saffi J, Menck CF. Both XPA and DNA polymerase Eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett*. 2012; 314: 108-118.

- [13] Carvalho H, Garrido LM, Furlan RL, Padilla G, Agnoletto M, Guecheva T, Henriques JA, Saffi J, Menck CF. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65: 989-994.
- [14] Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RdaS, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 2003; 85: 1083–1099.
- [15] Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* 2008; 18: 64-72.
- [16] Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M. *Xeroderma pigmentosum*. *Orphanet J Rare Dis.* 2011, 6:70. [Pub Med: 22044607]
- [17] Sarasin A, Strydom A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA Repair (Amst.).* 2007; 6: 265-269.
- [18] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1474-1485.
- [19] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175: 184-191.
- [20] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249-261.
- [21] Wilmore E, Frank AJ, Padgett K, Tilby MJ, Austin CA. Etoposide targets topoisomerase IIa and IIb in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol.* 1998; 53: 78-85.

- [22] Potter AJ, Rabinovitch PS. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res.* 2005; 572: 27-44.
- [23] D'Errico M, Pascucci B, Iorio E, Van Houten B, Dogliotti E. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. *Mech Ageing Dev.* 2013; 134: 261-269.
- [24] Andrade LN, Nathanson JL, Yeo GW, Menck CF, Muotri AR. Evidence for premature aging due to oxidative stress in iPSCs from Cockayne syndrome. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:3825-3834.
- [25] Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, post GC, Nafie JW, Kimura K, Cutts SM, Phillips DR. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 2008; 638: 110-121.
- [26] Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons Etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res.* 2008; 641: 43-47.
- [27] Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of Histone H2AX Phosphorylation Induced by DNA Topoisomerase I and II Inhibitors Topotecan and Mitoxantrone and by the DNA Cross-Linking Agent Cisplatin. *Cytometry A.* 2004; 58: 99-110.
- [28] Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 2001; 276: 47759- 47762.
- [29] Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9891-9896.

- [30] Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 2298-2304.
- [31] Koceva-Chyla A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K, Józwiak Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis*. 2005; 10: 1497–1514.
- [32] Zhao H, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Kinetics of histone H2AX phosphorylation and Chk2 activation in A549 cells treated with topotecan and mitoxantrone in relation to the cell cycle phase. *Cytometry A*. 2008; 73: 480-489.
- [33] Seifrtova M, Havelek R, Soukup T, Filipova A, Mokry J, Rezacova M. Mitoxantrone ability to induce premature senescence in human dental pulp stem cells and human dermal fibroblasts. *J Physiol Pharmacol*. 2013; 64: 255-265.
- [34] Kule C, Ondrejickova O, Verner K. Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast. *Mol Pharmacol*. 1994; 46:1234-1240.
- [35] Barasch D, Zipori O, Ringel I, Ginsburg I, Samuni A, Katzhendler J. Novel anthraquinone derivatives with redox-active functional groups capable of producing free radicals by metabolism: Are free radicals essential for cytotoxicity? *Eur J Med Chem*. 1999; 34:597-615.
- [36] Blasiak J, Gloc E, Warszawski M. A comparison of the *in vitro* genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol*. 2002; 49: 145–155.
- [37] Errington F, Willmore E, Leontiou C, Tilby MJ, Austin CA. Differences in the longevity of topo II alpha and topo II beta drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004; 53: 156-162.

- [38] Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brooks PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Genes Cells*. 2011; 16: 101-114.
- [39] Sakai A, Sakasai R, Kakeji Y, Kitao H, Maehara Y. PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks. *Genes Genet Syst*. 2012; 87: 265-272.
- [40] Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem*. 2001; 276: 40652-40658.
- [41] Gao R, Schellenberg MJ, Huang SY, Abdelmalak M, Nitiss KC, Nitiss JL, Williams RS, Pommier Y. Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2-DNA and Top2-RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *J Biol Chem*. 2014; 289: 17960-17969.
- [42] Gómez-Herreros F, Romero-Granados R, Zeng Z, Álvarez-Quilón A, Quintero C, Ju L, Umans L, Vermeire L, Huylebroeck D, Caldecott KW, Cortés-Ledesma F. TDP2-Dependent Non-Homologous End-Joining Protects against Topoisomerase II-Induced DNA Breaks and Genome Instability in Cells and In Vivo. *PLoS Genet*. 2013; 9: e1003226.
- [43] Bregmann DB, Halaban R, Van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, Warren SL. UV-induced ubiquitination of RNA-polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 11586-11590.
- [44] Latini P, Frontini M, Caputto M, Gregan J, Cipak L, Filippi S, Kumar V, Vélez-Cruz R, Stefanini M, Proietti-de-Santis L. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle*. 2011 ; 10 : 3719-3730.

Capítulo II

ROLE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR PROTEINS IN RESPONSE TO DNA DAMAGE INDUCED BY TOPOISOMERASE II INHIBITORS

Artigo aceito para publicação na revista *Mutation Research - Reviews in
Mutation Research*

APRESENTAÇÃO

Neste Capítulo será apresentado um artigo de revisão no qual são descritos os principais mecanismos de reparo de danos ao DNA envolvidos na resposta a drogas inibidoras da Topoisomerase II, com ênfase na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Este artigo foi aceito para publicação na revista *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.

O artigo faz uma descrição das enzimas topoisomerases e seu mecanismo de ação, bem como das principais drogas inibidoras destas enzimas. Também são descritas as possíveis lesões induzidas pelos inibidores da Topoisomerase II. Em seguida são relatados os mecanismos envolvidos no reparo destas lesões, no qual é descrita a participação das vias de reparo de quebras duplas (recombinação homóloga – HR – e junção de extremidades não homólogas – NHEJ). Porém, o enfoque principal deste artigo é a participação da via NER na remoção das lesões induzidas pelos inibidores da Topoisomerase II.

Por fim, o artigo apresenta um modelo de como algumas lesões induzidas por estas drogas podem ser reparadas, destacando a participação da via NER na remoção de lesões do tipo adutos. E em relação à remoção dos complexos Topo II-DNA, além das vias já conhecidas de reparo, também é descrita a possível participação de algumas proteínas da via NER neste processo.

Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA damage induced by Topoisomerase II Inhibitors

Jaqueline C. Rocha^{1,2,#}, *Franciele F. Busatto*^{1,2,#}, *Temenouga N. Guecheva*³,
Jenifer Saffi^{1,2 *}

¹Laboratory of Genetic Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre – RS, Brazil

²Post-Graduation Program in Molecular and Cell Biology (PPGBCM) – Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS, Brazil

³Department of Biophysics, Federal university of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS, Brazil

These authors contributed equally to this review

*Corresponding author: Laboratory of Genetic Toxicology; Rua Sarmento Leite, 245, Anexo III, Bairro Centro, CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil.

Tel.: +55 51 33038861

E-mail address: jenifers@ufcspa.edu.br (J. Saffi)

ABSTRACT

In cancer treatment, chemotherapy is one of the main strategies used. The knowledge of the cellular and molecular characteristics of tumors allows the use of more specific drugs, making the removal of tumors more efficient. Among the drugs of choice in these treatments, topoisomerase inhibitors are widely used against different types of tumors. Topoisomerases are enzymes responsible for maintaining the structure of DNA, altering its topological state temporarily during the processes of replication and transcription, in order to avoid supercoiling and entanglements at the double helix. The DNA damage formed as a result of topoisomerase inhibition can be repaired by DNA repair mechanisms. Thus, DNA repair pathways can modulate the effectiveness of chemotherapy. Homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) are the main pathways involved in the removal of double strand breaks (DSBs); while nucleotide excision repair (NER) is mainly characterized by the removal of lesions that lead to significant structural distortions in the DNA double helix. Evidence has shown that DSBs are the main type of damage resulting from the inhibition of the DNA topoisomerase II enzyme, and therefore the involvement of HR and NHEJ pathways in the repair process is well established. However, some topoisomerase II inhibitors induce other types of lesions, like DNA adducts, interstrand crosslinks and reactive oxygen species, and studies have shown that other DNA repair pathways might be participating in removing injury induced by these drugs. This review aims to correlate the involvement of proteins from different DNA repair pathways in response to these drugs, with an emphasis on NER.

Keywords: DNA Topoisomerases, Topoisomerase II Inhibitors, DNA Repair,
NER

Contents

1. DNA Topoisomerases

2. Topoisomerase Inhibitors

2.1. Topoisomerase I Inhibitors

2.2. Topoisomerase II Inhibitors

3. Topoisomerase II Inhibitors versus DNA repair

4. Nucleotide Excision Repair

5. Topoisomerase II Inhibitors versus Nucleotide Excision Repair

6. Conclusions

Conflict of interest statement

Acknowledgments

References

1. DNA Topoisomerases

Topoisomerases are well described enzymes that control DNA supercoiling and entanglements introducing temporary single or double strand breaks in DNA, thus being essential in maintaining the integrity of DNA during transcription and replication processes. In mammalian cells, there are three types of topoisomerases: type I, type II and type III [1, 2, 3]. The two major classes, type I and type II, are distinguished by the number of DNA strands that they cleave and the mechanism by which they alter the topological properties of the genetic material [3, 4]. Despite their differences in specificity, their catalytic mechanism is a common feature between the different types of enzyme. In all cases, this mechanism consists of a nucleophilic attack of a DNA phosphodiester bond by a catalytic tyrosine residue from the topoisomerase, but while type I enzymes cleave only one strand of DNA for catalysis, those in type II cleave both strands to overcome the entanglements or to avoid supercoiling (Fig. 1). The intermediates formed in this process are commonly referred to as cleavable complexes [1, 3, 4].

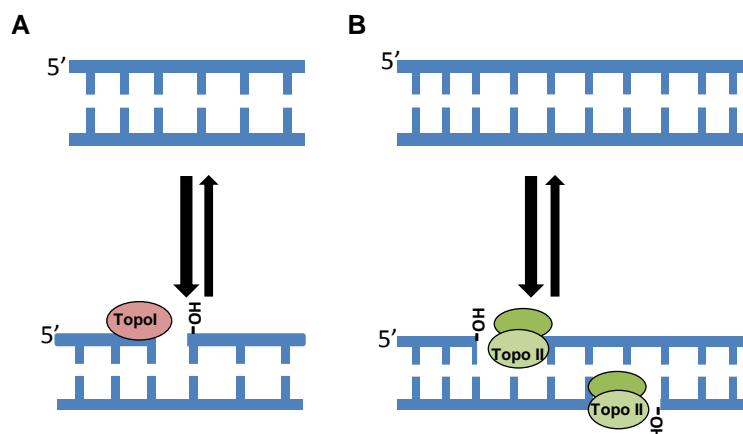


Figure 1: Different action mechanisms of topoisomerase I and II in the formation of DNA cleavage complexes. (A) Topoisomerase IB cleaves a single DNA

strand forming a covalent complex at the 3'-end of the breaks. (B) The action of topoisomerase II in both DNA-strands, forming the covalent complexes at 5'-end of the breaks.

Eukaryotic type I topoisomerases (topo I) are monomeric enzymes organized in two classes: topo IA cleaves a single-strand segment and then allows the intact single strand to pass through the break, needs divalent metal ions for DNA scission and attaches covalently to the 5'-terminal phosphate of the DNA; whereas topo IB works by letting the broken strand rotate around the intact strand, does not require divalent metal ions and covalently links to the 3'-terminal phosphate [1, 4]. These enzymes require no high energy co-factor and despite modulating DNA under- and over-winding, they are not able to remove knots or tangles from duplex DNA [4].

Eukaryotic type II topoisomerases (topo II) cleave both DNA-strands and let the duplex pass through the breakage [1, 2, 3]. These enzymes function as homodimers and require divalent metal ions and adenosine triphosphate (ATP) for complete catalytic activity [3, 4]. Mammals have two isoforms of topo II, topoisomerase II α and topoisomerase II β , which are closely related, but are encoded by separate genes and also differ in their molecular masses; topo II α has 170 kDa, while topo II β has 180kDa [3, 4, 5, 6]. The two enzymes show distinct patterns of expression and physiological functions in vertebrate cells. Topo II α is essential for the survival of proliferating cells and its levels are regulated over the cell cycle, showing concentration peaking in G2/M. This isoform is associated with replication forks and remains tightly bound to chromosomes during mitosis. Topo II β , on the other hand, shows an independent status in relation to the proliferation and dissociates from

chromosomes during mitosis. This isoform cannot compensate for the loss of topo II α in mammalian cells, suggesting that both enzymes have their own and different roles [4, 7, 8].

2. Topoisomerase Inhibitors

Topoisomerase inhibitors are among the most effective and most commonly used anticancer drugs. The main target of these inhibitors is the DNA cleavage/ligation step in the catalytic cycle of the enzyme, preventing the ligation of breaks generated by topoisomerases. Consequently, there is an increase of the cleavable complexes, which are converted in DNA damage during replication and transcription. Moreover, there are important selectivity and non-ambiguity characteristics in these drugs in view of the fact that clinically relevant topo I inhibitors do not affect topo II, and nor do topo II inhibitors affect topo I [1, 2].

2.1. Topoisomerase I Inhibitors

Camptothecin (CPT), an alkaloid isolated from the plant *Camptotheca acuminata* in the 1960s, was the first topo I inhibitor identified having antitumor properties, although its mechanism of action was only discovered about 20 years later [9]. There are now semi-synthetic derivatives of CPT approved by the FDA (Food and Drug Administration). Fig. 2A shows the structures of some topo I inhibitors and the presence of an α -hydroxylactone E-ring. One of the CPT derivatives, topotecan, is already used in clinical routines, being prescribed

for ovarian cancer and recurrent small cell lung cancer. Another FDA-approved CPT derivative is irinotecan, a prodrug that needs to be converted into its active metabolite SN-40, and is recommended mainly for gastrointestinal tumors. There are some common side effects of this drug, such as diarrhea, which can be severe, temporary liver dysfunction, and myelosuppression, which also occurs in topotecan treatment [1, 9].

An important limitation in all CPT derivatives is that they are rapidly (within minutes) and spontaneously inactivated as a consequence of the E-ring opening, changing from the lactone form to the carboxylate form, which is favored by the physiological neutral pH. Moreover, this form tightly binds to serum albumin, depleting in consequence the lactone form that contains the intact E-ring [1, 2]. In addition to this characteristic, these drugs also have other limitations, such as the rapid reverse of the cleavable DNA-topo I complex after drug removal, which imposes the necessity of long infusions for patients, the overexpression induction of the drug efflux membrane transporters (glycoprotein-P), which generates a cross-resistance to CPT derivatives, and the side-effects which are dose-limiting [1, 10]. To overcome all these limitations, non-camptothecin derivatives are currently in clinical development and in clinical trials. The indenoisoquinolines were the first non-camptothecin topo I inhibitors discovered that offer several advantages over the camptothecins. They are chemically more stable, present more persistent cleavage complexes and can overcome multidrug resistance by drug efflux pumps [10]. These compounds are derived from a 3-arylisoquinoline structure, a precursor in the development of various topo I inhibitors with a 3-arylisoquinoline nucleus [11].

2.2. Topoisomerase II Inhibitors

Unlike topo I inhibitors, there are more classes of drugs that target topo II enzymes. In addition to drugs that increase the levels of cleavable complexes, some topo II inhibitor drugs are presumed to act primarily by inhibiting the catalytic site, preventing the ligation of the enzyme to the DNA. These differences give rise to the different names for topoisomerase inhibitors; in the first case we have the topoisomerase poisons, while in the second we have the catalytic inhibitors of topoisomerases [1, 2].

The most widely used clinically are those classified as topo II poisons, such as etoposide, and the anthracyclines such as doxorubicin and daunorubicin and their analog mitoxantrone. These agents increase levels of topo II-DNA cleavage complexes, converting this essential enzyme to a potent cellular toxin [6]. Some poisons act by inhibiting the ability of topo II to re-ligate the DNA cleaved strands, and thereby these agents not only increase the level of cleavage complexes, but also increase the lifetime of these complexes [6, 12].

Daunorubicin was the first anthracycline discovered, in the 1950`s, from a bacteria *Streptomyces* and it is still used primarily for the treatment of acute leukemia. Doxorubicin (DOX) was also discovered in another bacteria toxin soon after Daunorubicin and it is now more widely used. It is recommended for the treatment of breast cancer, bone and soft tissue sarcoma, bladder cancer, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma [1, 13]. In the case of the topo I inhibitor camptothecin, the effect of anthracyclines on topo II was demonstrated after their approval by the FDA as an anticancer agent [1]. It

had already been shown that at low doses DOX poisons topo II, increasing the levels of complexes, but that at higher concentrations it suppresses the formation of these complexes [3].

We should also note epirubicin, which is a semisynthetic derivative of DOX and was developed to limit its side effects. A positional change of the hydroxyl group at C4 of DOX conferred to epirubicin some pharmacokinetic and metabolic characteristics such as increased volume of distribution, enhanced total body clearance and a shorter terminal half-life, without changing the mode of action and spectrum of activity when compared to DOX (1, 13). There is also idarubicin, an analog obtained from daunorubicin, which is active against acute myelogenous leukemia, multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma and breast cancer. When compared to daunorubicin, idarubicin presents a broader spectrum of activity, which may be attributed to the increased lipophilicity and cellular uptake and to the improved stabilization of the ternary complex of drug-topo II-DNA (13, 14).

In addition to their anti-topo II activity, anthracyclines can also undergo reduction reactions in the presence of metals and oxygen, forming reactive oxygen species (ROS) [13, 14]. Moreover, the toxicity of anthracyclines is enhanced by their ability to form adducts in the DNA, which is favored by the presence of formaldehyde [15], and also by the formation of DNA interstrand crosslinks (ICLs) [16]. Despite their effectiveness, the use of anthracyclines is limited by their cardiotoxicity, which is due in part to the high levels of ROS that can be formed, damaging cellular structures [17]. In addition, the imbalance in the intracellular calcium levels by the reticulum sarcoplasmic [18] as well as the

specific poisoning of the β isoform, can also contribute to the cardiac toxicity of DOX [19].

The anthracenedione mitoxantrone (MXT) is a synthetic analog of anthracyclines originally developed to reduce the cardiotoxicity of these drugs, and whose original structure maintained the planar polycyclic aromatic ring [20, 21]. It was approved by the FDA in 1996 for the treatment of prostate cancer, and it is used in first line therapy for pediatric and adult acute leukemia and second line therapy for breast and prostate cancer and hematological malignancies. In addition, MXT has also been approved for the treatment of multiple sclerosis since 2000 [1]. Besides acting as a topo II poison, due to its structure MXT is still able to intercalate between DNA bases, forming adducts, ICLs and ROS, like anthracyclines [13, 14, 21, 22]. It has the same cytotoxicity as DOX, but less cardiotoxicity, which can be explained by its lower potential to undergo redox reactions, and the imbalance in the intracellular calcium levels not changing as much as after DOX treatment [14, 18].

Etoposide is derived from a podophyllotoxin, a natural product isolated from the plant *Podophyllum peltatum* [12, 23]. It is one of the most widely used anticancer drugs, active against many solid tumors, like small cell lung cancers, testicular and germ cell tumors, endocrine tumors, osteosarcomas and Ewing's sarcomas, neuroblastomas and Kaposi sarcomas [1]. Etoposide was among the earliest anticancer agents identified as targeting the type II topoisomerase enzyme and is the most selective drug for targeting the topo II cleavage-complexes currently in clinical use. It does not act as a DNA intercalating agent; its main action mechanism is the DNA-enzyme complex formation [6, 24]. The binding of one molecule of etoposide to each monomer of the enzyme allows

the formation of single or double strand breaks, depending on the molar ratio between the drug and the enzyme [24]. Fig. 2B shows the structure of anthracyclines and mitoxantrone, showing the presence of a planar polycyclic aromatic ring, and etoposide, a non-intercalator inhibitor.

Despite the effectiveness of topo II poisons in cancer treatment, their use has some limitations. First, the use of anthracyclines and MXT may be limited by their cardiotoxicity, even though it is reduced in MXT compared to DOX [14, 18, 19]. Second, the formation of secondary malignancies that arise from drug-induced translocations (named therapy-related acute myeloid leukemia) is an important side effect of targeting topo II with topo II poisons [25]. Studies indicate that topo II β rather than topo II α is implicated in the adverse effects of topo II targeted drugs, and in this way, the development of new compounds that are specific inhibitors of the α -isoform is important to reduce the secondary malignancies or adverse effects induced by these drugs [19, 25].

The other class, topo II catalytic inhibitors, act by different mechanisms, which include binding to the ATP site, prevention of the ATP hydrolysis step and trapping the enzyme in a closed clamp, blocking the DNA cleavage or preventing the enzyme binding to DNA [26]. The most important class of these compounds is the bisdioxopiperazines (Fig. 2C), such as ICRF-154, ICRF-159, ICRF-193 and ICRF-187 (dexrazoxane), which are not used as antitumour drugs due partly to their reduced antitumor activity, but are used mainly to prevent anthracycline cardiotoxicity [2, 17, 27]. Bisdioxopiperazines prevent ATP hydrolysis and inhibit the reaction after DNA strand passage by sequestering the protein as a closed clamp in the DNA, and as a result of this action, DNA breaks are induced [28, 29, 30, 2]. Interestingly, Swift et al [31]

have shown that sobuzaxane (a drug containing the bisdioxopiperazine ICRF-154) enhances the formation of adducts by DOX treatment through formaldehyde generated during its intracellular degradation. In this treatment DOX was shifted from a topo II acting drug to a DNA-adduct forming drug and the combination of the two drugs results in decreased cardiotoxicity and achieves cell kill at lower drug concentrations than required when DOX is used as a single agent [31].

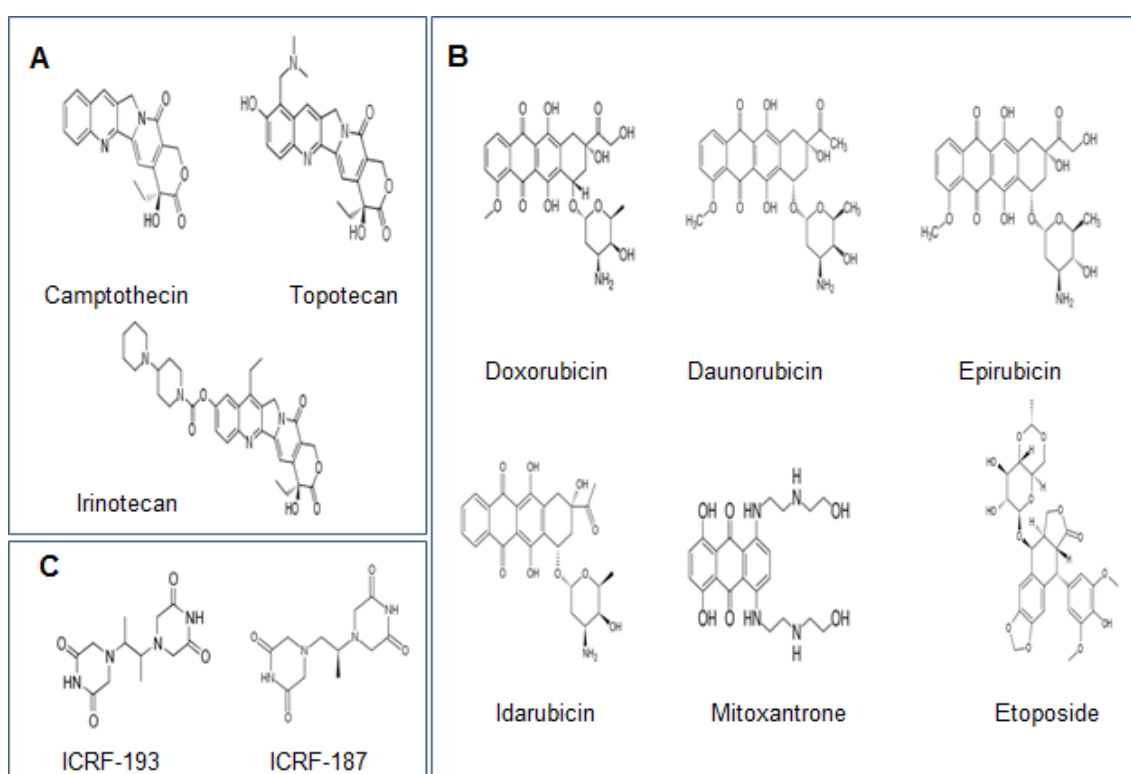


Figure 2: Topoisomerase inhibitor structures. (A) Topoisomerase I inhibitors, showing the structure of camptothecin and its semi-synthetic derivatives. (B) Topoisomerase II inhibitor type poisons: anthracyclines doxorubicin, daunorubicin, epirubicin and idarubicin; their analog mitoxantrone, and the non-intercalator etoposide. (C) Topoisomerase II catalytic inhibitors: the structure of bisdioxopiperazines ICRF-187 and ICRF-193.

3. Topoisomerase II Inhibitors versus DNA repair

The effectiveness of cancer treatment can be modulated by various mechanisms of drug resistance, highlighting the DNA repair, which works by removing the lesions before they become toxic to the cells. In Fig. 3 the main lesions induced by many topo II poisons are represented.

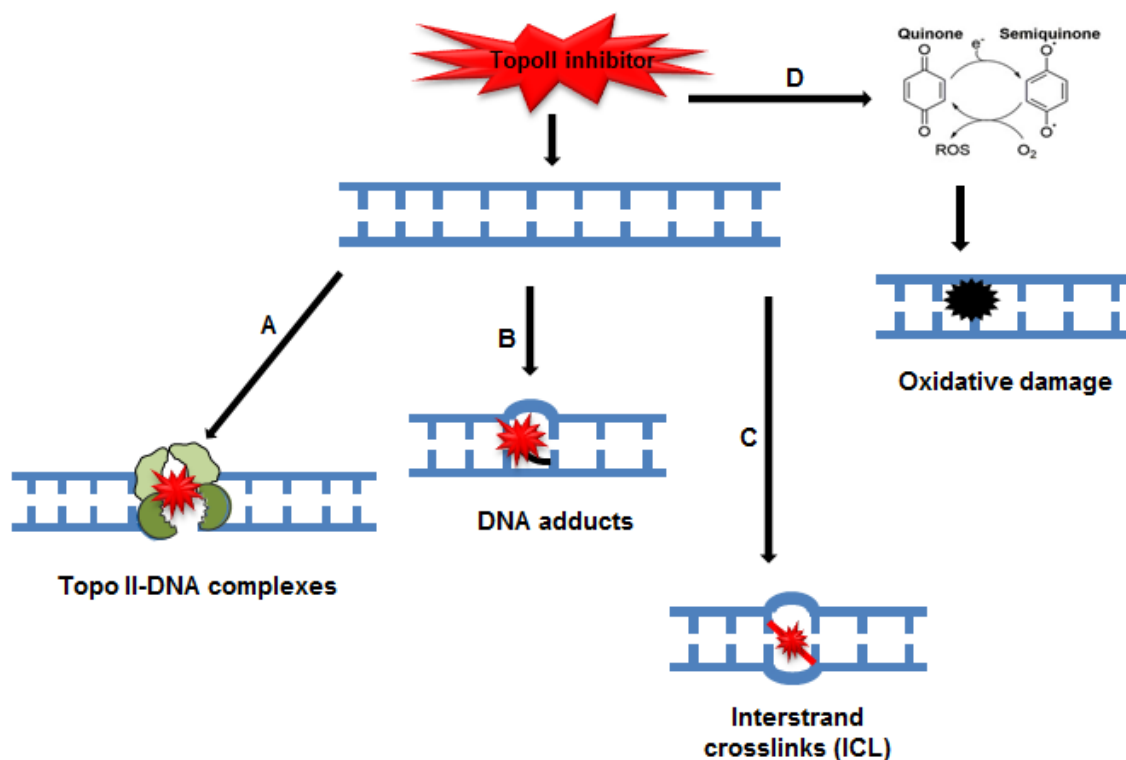


Figure 3: Representation of possible lesions induced by topoisomerase II inhibitor type poisons. (A) Topo II-DNA stabilized complex induced by anthracyclines, mitoxantrone and etoposide. Anthracyclines and mitoxantrone can intercalate into DNA and be activated to form DNA-adducts (B) or interstrand crosslinks – ICLs (C). (D) Reactive oxygen species can be formed via enzymatic reduction of the quinone moiety of anthracyclines and mitoxantrone to a semiquinone, as indicated, and subsequently can induce oxidative DNA damage.

Up to now, the mechanisms involved in the removal of lesions induced by topo II inhibitors are not completely understood. Topo II complexes can be generated in both the replication and transcription process and their removal is

fundamental for cellular survival, since their processing leads to the generation of DSBs [1, 2, 32, 33]. This role is accomplished in part by the action of a tyrosyl-DNA phosphodiesterase TDP2, which hydrolyses 5'-DNA bonds, the structures induced by topo II poisons [34]. The removal of topoisomerases, mediated by the degradation of the enzyme by proteasome, is also possible, and can occur in a ubiquitination-dependent way, via the 26S proteasome [35], or independent of ubiquitination, via the 20S proteasome [36]. A recent work showed that previous removal of topo II is necessary to enable hydrolysis of 5'-DNA bonds by TDP2 [37]. Another pathway to repair topo II complexes involves nucleolytic removal of topoisomerase from DNA, in which the MRN(X) complex and the Sae2/CtIP proteins have been shown to take part in the resolution of topo II complexes [1, 38]. The action of the TDP2, proteasome or nucleolytic pathways in the removal of the complexes leads to generation of DNA damage, mainly DSBs, which can be repaired by action of the proteins of the recombination pathway.

Several studies, from yeast to human cells, have demonstrated the importance of non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) pathways in the repair of DNA damage induced by topo II poisons [39 - 45]. In one of these studies both HR and NHEJ pathways were important for survival in rodent cells, as expected due to DSBs induced following DOX treatment [41]. In addition, human pancreatic adenocarcinoma BRCA2-defective cells (HR-deficient) are very sensitive to topo II inhibitors (MXT, etoposide and amsacrine) and nude mice harboring tumors defective in this protein are also very sensitive compared to tumors with normal BRCA2 function [44]. Moreover, DNA-PK inhibition improves the sensitivity of cancer

cells to MXT, and chronic lymphocytic leukemia patients with higher expression of this protein were more resistant to MXT treatment and have a shorter survival [43]. Interestingly, in most of these works, cells deficient in proteins of NHEJ, like DNA-PKs, Ku70 and Ligase IV, are highly sensitive to topo II poisons, while cells deficient in HR pathway are somewhat less sensitive, indicating the prevalence of NHEJ pathway in the removal of lesions induced by these drugs [39, 40, 42].

The importance of NHEJ and HR pathways for survival following treatment with etoposide or DOX, together with the proteins of other pathways, has been assessed in some studies with chicken DT40 cells. These cells are an excellent tool for investigating the repair deficiencies, effects and mechanisms of anticancer drugs, since they have a targeted transfection efficiency higher than mammalian cells and also a high proliferative rate (similar to that observed in cancer cells) [42, 46]. Addachi et al [39] investigated the effects of etoposide in DSB-repair mutant cells and observed a higher sensitivity of NHEJ compared to HR mutant cells [39]. This higher sensitivity of NHEJ deficient cells was confirmed in another study where the sensitivity to etoposide and DOX was assessed in a panel of isogenic DNA repair mutant DT 40 cells [42]. Removal of topo II by TDP2 action generates “clean” DSBs, which are ideal substrates for NHEJ repair pathways and, in an interesting way, preserve DNA sequence, suggesting an error-free mechanism for repair of these lesions. HR pathways however work in a TDP2-independent manner, probably in the repair of topo II-induced DSBs generated by action of nucleases [47]. In addition, absence of TDP2 causes an increase in Rad51 foci (indicative of repair by HR) following etoposide treatment [47]. In fact, TDP2 defective cells are more sensitive to

etoposide than cells defective in the nuclease CtIP [42], thus supporting the hypothesis that TDP2 and NHEJ pathways are prevalent in the removal of topo II complexes and DSBs, rather than CtIP and HR pathways.

Tammaro et al [33] have shown that low doses of etoposide induce DSBs predominantly during replication while higher doses induce DSBs both during the replication and the transcription process [33]. Interestingly, proteasome inhibition prevents DSB formation only during transcription indicating that proteasome acts in a transcription-dependent mechanism of DSB generation, and that the replication-dependent mechanism is a parallel way that does not require proteasome-mediated degradation of topo II complexes [33]. TDP2 is required to maintain gene transcription in sites of abortive topo II activity induced by etoposide [48]. As previously mentioned, removal of topo II can be achieved by proteasome [35, 36] and enables the processing of complexes by TDP2 [37]. These results lead us to think that proteasome/TDP2 can be the main pathway to the repair of topo II complexes during transcription. However, since TDP2 and NHEJ appear to be predominant in response to these lesions, the exact mechanism of repair during replication still needs to be determined.

Likewise, studies have shown that DNA-strand breaks are the main lesions resulting from the activity of catalytic inhibitors [29, 30, 49, 50]. A study of single-gene deletion mutants in *S. cerevisiae* indicates that HR plays a predominant role in the repair of lesions induced by ICRF-187, while in mammalian cells, both HR and NHEJ seem to be important [30]. Interestingly, in response to ICRF-193, HR mutant cells were not sensitive while elevated sensitivity was observed in both NHEJ and in TDP2 mutant cells, revealing that

this drug can act as a topo II poison, like etoposide, or that TDP2 could participate in the removal of this different type of lesion together with NHEJ pathways [42].

As already mentioned, DSBs are the main lesions caused by topo II inhibitors, thus the NHEJ and HR pathways are thought to be responsible in removing these lesions. However, in response to DOX, which is known to generate topo II-DNA complexes, TDP2 deficient cells are not as sensitive as they are in response to etoposide, indicating additional cell-killing mechanisms for DOX [42]. In fact, anthracyclines and MXT have their main action mechanism on targeting topo II, but other important lesions can also be generated in the DNA duplex, mainly bulky-DNA adducts, thus the involvement of other pathways in response to this kind of topo II inhibitors is suspected.

4. Nucleotide Excision Repair

Nucleotide excision repair (NER) is the most versatile amongst the DNA repair pathways, and is involved in the removal of lesions that lead to significant structural distortions in the DNA double helix. These lesions include pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts, adducts generated from photoactivated psoralens, cyclopurines, alkylating agents and polycyclic carcinogens [51, 52]. Deficiencies in human NER can give rise to hereditary diseases such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD). Patients suffering from these diseases are extremely sensitive to sunlight, and those with XP, complementation group XPA to XPG, are deficient in the excision step of damage induced by ultraviolet (UV) rays and

other genotoxic agents, showing a high sensitivity to these agents and a strong predisposition to skin cancer [52 - 54].

In terms of lesion-recognition, NER is divided into two sub-pathways: transcription coupled repair (TCR) and global genome repair (GGR). In TCR, the initial step is the blockage of RNA polymerase at the lesion during transcription. As a result, the CSB protein becomes tightly bound to polymerase and recruits the CSA protein to the nuclear matrix after the DNA damage, which is necessary for CSB stabilization. Together, CSB and CSA recruit other proteins like HMG1, XAB2 and TFIIIS to the damage site. The specific interaction between XAB2 and the protein XPA, an important protein involved in the common pathway of NER, suggests that this might be the key protein to connect the recognition step to the rest of the pathway [51, 52, 54 - 56].

Unlike TCR, where the RNA polymerase blockage is sufficient to initiate the process, in GGR other specific proteins are necessary for the recognition of the lesions. Therefore, this step may be limiting in the repair rate, considering that the tightness of protein ligation in damage recognition depends on the chemical structure of the lesion as well as the way it interferes in the double helix structure. The main damage sensor in GGR is XPC, which is stabilized and assisted by its association with the UV excision repair protein RAD23B and centrin 2 (CETN2). XPC is a DNA ligand protein that detects the damage in an indirect manner, by binding to the undamaged strand opposite to the lesion, and is polyubiquitinated in a reversible manner, which does not result in the protein's degradation but increases its affinity to the DNA. This mode of DNA binding also explains the remarkably broad range of lesions repaired by GGR, as all lesions that induce NER are helix-destabilizing and create short unpaired

regions. For some UV-induced lesions, mainly CPDs, the participation of UV-DDB proteins is still necessary [54, 55, 57, 58].

After lesion recognition, the recruitment of other proteins occurs and the sub-pathways converge to a common pathway for the removal of the lesion. The TFIIH complex consists of ten protein subunits and is recruited together with the protein XPG that is responsible for its stabilization. TFIIH was originally identified as an essential transcription initiation factor, but it can switch between functions in transcription and in NER. Between the components of the complex are the helicases XPB and XPD that act in opposite directions; while XPB unwinds the DNA in 3`-5` direction, XPD acts from 5`-3`, resulting in the opening of the region adjacent to the lesion. After DNA unwinding, XPA and RPA proteins (which in some cases may be already recruited before TFIIH), protect the single strand region of the DNA and act as regulators for the recruitment of the next proteins that are necessary for the incision and excision of the lesion [51, 55, 56, 60].

The next step is the incision of the strand that occurs on both sides of and a few nucleotides of distance from the lesion. It includes the coordinated action of the endonucleases XPF-ERCC1 and XPG, which remove about 25-30 nucleotides. The XPF protein cleaves the strand containing the damage at 5` of the lesion, while XPG does it in the 3`. ERCC1 seems to act just in the stabilization of XPF. Soon after, the cleaved segment is removed and a DNA polymerase re-synthesizes this segment using the intact strand as a template, restoring the intact DNA chain [51, 52, 54, 56, 60].

Actually, NER factors have been recognized to have different roles beyond canonical DNA repair pathways of bulky lesions (TCR or GGR). The

involvement of endonuclease XPF-ERCC1 in the repair of ICLs, performing the incision of the lesions, is well demonstrated. The exact mechanisms of this incision are not yet clear however, since other endonucleases are also involved in this process [61] and, a recent study has shown that CSB protein interacts and modulates the activity of SNM1, another nuclease involved in the resolution of ICLs [62]. Studies have also demonstrated that NER proteins like CSB, CSA, XPC, XPA and XPG are involved in the repair of oxidative damage, whether in cooperation or not with base excision repair [63]. Indeed, NER proteins (XPB, XPD, XPC, CSB, XPA with RPA, XPG and XPF/ERCC1) are recruited to promoters of nuclear receptors genes, even in the absence of genotoxic insults, showing the role of NER proteins in different cellular processes besides DNA damage repair. The participation of these proteins in the transcription, as a part of TFIIH, is distinct from their function in the NER pathway [64].

5. Topoisomerase II Inhibitors versus Nucleotide Excision Repair

The early studies linking the NER proteins to topo II inhibitors indicate that the XPG endonuclease is important for survival in response to TOP-53, an epipodophyllotoxin similar to etoposide [45]. In this work, *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the excision repair protein Rad13 (human homologous XPG) have approximately a ten-fold lower survival rate than wild-type cells [45]. In addition, yeast cells lacking the endonucleases Rad2 (homologous with human FEN-1) and Uve1 (involved in an alternative pathway to repair UV-induced damage and other lesions) are also very sensitive to TOP-53 [45]. These results suggest that excision repair proteins could be involved in the

removal of proteins covalently bound to DNA or are instead required for the processing of DNA strands, allowing them to be substrates to HR or other break repair pathways [45]. In another study, *Saccharomyces cerevisiae* cells defective in the Ssl2 protein (or Rad25) are highly sensitive to DOX. Overexpression of this protein renders cells resistant to the drug, reinforcing participation of NER proteins in response to topo II inhibitors, since Ssl2 is homologous with human XPB, a DNA helicase involved in the initial steps of transcription and in NER as a subunit of the complex TFIIH [65].

As topo II inhibitors like DOX can also induce lesions such as adducts, ICLs and ROS, Spencer et al [41] evaluated the response of rodent cells deficient in different repair pathways to treatment with DOX and two derivatives with a higher ability for adduct formation (barminomycin and doxoform). Cells deficient in NER proteins XPB, XPD and XPG showed sensitivity similar to wild type cells when treated with DOX, however, they were slightly more resistant to adduct inducers [41]. In the same way, in a recent work, chicken DT-40 XPA and XPG-defective cells were slightly resistant in response to DOX [42]. These contradictory results in some points can be attributed to the different experimental models, rodent [41] or chicken cells [42], and the different experimental conditions used. In addition, despite the association of deficiencies in NER with greater sensitivity to drugs that generate DNA adducts, this is not a rule, since some drugs require NER activity to become toxic to the cells. An example is the case of ectenascidin-743 which is dependent of functional TCR-NER for its toxicity [66] and therefore the contribution of the NER pathway for cell sensitivity may be dependent on the specific drug.

A previous study of our group has shown that the helicase XPD, one of the main NER proteins, is involved in the repair of DOX-induced lesions [67]. Human fibroblasts containing mutations in three different regions of the XPD gene (corresponding to clinical features of XP, TTD and XP/CS) presented higher sensitivity to DOX, and complementation of XPD-deficient cells with wild type protein diminished DOX sensitivity [67]. XPD-deficient cells also have a lower DNA repair capacity, as measured by unscheduled DNA synthesis (UDS), compared to proficient fibroblasts [67]. Interestingly, in the work previously mentioned, rodent cells deficient in XPB, XPD and XPG proteins presented equal sensitivity to DOX compared to proficient cells [41]. However, this could be attributed to differences in the experimental conditions as the rodent cells were treated for only 4 hours with DOX [41]. In fact, in our studies with human cells the sensitivity was observed when cells were treated for 24 to 72 hours, while after short periods of treatment (2 h) there were no differences between deficient and proficient cells [67]. Indeed, XPD-mutated human fibroblasts silenced in topo II were still more sensitive to DOX than the proficient cell line indicating that besides the DSB induced by topo II blockage, there are other toxic lesions induced by DOX that require the presence of functional NER proteins to be removed [67]. The connections between XPD deficiency and response to topo II inhibitors are also studied in clinical practice. XPD gene polymorphisms associated with an impaired DNA repair capacity result in a better sensitivity and treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia (AML) [68]. The therapeutic regimens used in these patients contain topo II inhibitors like etoposide and daunorubicin or idarubicin, reinforcing the

idea that NER could be involved in repair of lesions induced by these drugs [68].

In response to Cosmomycin D, an anthracycline not yet completely characterized, human fibroblasts deficient in XPA or XPC proteins present elevated DNA damage levels and increased apoptosis, which were reduced when cells were pre-treated with a caspase inhibitor [69]. The higher sensitivity of these cells was also observed in response to DOX treatment [69]. Another study with NER-deficient human cells showed that both XPA and XPV (polymerase eta, involved in translesion synthesis - TLS) proteins are needed for effective repair of DNA lesions induced by clinical doses of DOX [70]. Although polymerase eta has been traditionally implicated in TLS, this protein could also be important during repair of lesions by the NER pathway during the S phase [71] and therefore, its participation together with XPA through NER cannot be excluded in response to DOX. Moraes et al [70] also showed that co-treatment with an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks) and related-proteins kinases (PIKKs), such as DNA-PKs (involved in NHEJ) potentiates the higher sensitivity to DOX only in NER-deficient cells, while in proficient cells it does not occur [70]. These results may indicate that these kinases are implicated in signaling and help to process DSBs that could be induced by defective repair of DOX-induced lesions by XPA and XPV-deficient cells [70].

For a better understanding of the role of NER proteins in response to topo II inhibitors, we have been working with MXT, which forms adducts and ICLs, in addition to topo II complexes, like anthracyclines. Our recent results have shown that XPA, XPD, XPC and CSB cells are very sensitive to MXT and despite the high sensitivity of all NER-deficient cells. CSB cells are more

sensitive than XPC cells [72]. We also observed a very pronounced sensitivity of CSB cells in response to etoposide (which forms mainly Topo II-DNA complexes) while XPC cells have sensitivity similar to proficient cells [72]. In addition, our results demonstrated more differences between CSB and XPC cells in response to MXT, including cell cycle profile, DNA synthesis and topo II-DNA complex formation. In response to MXT, CSB cells present an arrest of cells in S phase, decreased DNA synthesis and a more intense signal for topo II complexes. Indeed, complementation of CSB-deficient cells with wild type protein renders cells more resistant to MXT and also diminishes the topo II-DNA complex formation signal [72]. Previous works have shown that repair of topo I-DNA complexes formed by CPT is inhibited in CSB cells [73] and that CSB can modulate the transcription-mediated DNA strand breaks induced by CPT [74]. Considering that CSB and XPC proteins are involved in distinct NER sub-pathways (TCR and GGR, respectively), the lesions induced by topo II inhibitors are differently processed by sub-pathways and CSB is necessary for the processing of lesions like topo II-DNA complexes [72].

Since one important type of lesion induced by anthracyclines and MXT are DNA-adducts [15, 21], the studies showing the high sensitivity of NER-deficient cells to DOX, Cosmomycin-D and MXT indicate that this type of lesion can be repaired by a classical NER pathway. Although these drugs can form lesions like ROS and ICLs [13, 14, 16], up to now there are no studies showing formation of these types of lesions and their repair by NER. Indeed, in our studies with MXT we were not able to detect ROS production and therefore that these lesions are responsible for sensitivity of NER-deficient cells [72].

In response to etoposide, Despras et al [40] demonstrated that in HeLa cells, long-term silencing of XPC gene expression (which encodes the NER protein involved in the GGR lesion recognition step) leads to a mild sensitivity [40]. XPC knock down cells used in this study also showed an impaired NHEJ activity, therefore this may contribute to the higher sensitivity, and not necessarily the deficiency in the NER pathway, since XPA silenced cells in turn, showed no sensitivity to etoposide [40]. On the other hand, Maede et al [42] have shown that chicken XPA and XPG-deficient cells had increased sensitivity to etoposide [42], similar to that observed in XPG-deficient yeast cells [45]. Tsai et al [75] have demonstrated that etoposide treatment in human lung cancer cells increases the expression of ERCC1 (a critical protein involved in the cleavage of DNA lesions together with XPF during NER) and knockdown of ERCC1 also sensitizes the cells to treatment [75]. The endonuclease ERCC1-XPF can act on resolution of topo I-DNA complexes induced by CPT in mammalian cells, operating as an alternative repair pathway besides the TDP1, a tyrosyl-DNA phosphodiesterase that hydrolyses phosphotyrosyl bonds at DNA 3'-ends, as induced by topo I inhibitors [76]. Indeed, it has been shown recently that ERCC1-XPF in the presence of RPA can cleave 3'-phosphotyrosyl bonds containing oligonucleotides (similar to topo I-complexes), and other NER factors (Pol δ , FEN1 and LigI) can fill and seal the gap, similar to the normal NER mechanism [77].

The NER involvement in response to topo II catalytic inhibitors is not clear. In response to F11782, a catalytic inhibitor that acts by preventing the binding of topoisomerase to DNA, cells present XPG inhibition, and resistance to this drug is associated with decreased NER activity [78, 79]. Also in response

to bisdioxopiperazines, yeast cells lacking RAD1 and RAD14 (homologous with human XPF and XPA, respectively) showed no sensitivity against ICRF-187 [30]. In the same way, XPA or XPG-defective chicken cells have a very slight sensitivity to the same drug [42]. In view of the few works conducted in this field, it is not yet possible to establish a relationship between NER and response to topo II catalytic inhibitors. Therefore, more studies are needed to answer this question.

Another approach has considered NER proteins acting in a non-canonical pathway. The proteins XPC, XPA, XPG and XPF/ERCC1 have been shown to be recruited at the promoter of activated genes and to be necessary to achieve optimal DNA demethylation and histone modifications for efficient RNA synthesis, even in the absence of DNA damage, revealing their role in other functions besides damage repair [64]. NER factors XPG, XPF, XPA, XPD and XPB are necessary to form DSBs during the processing of R-loops (RNA-DNA hybrid) forming by absence of transcription factors or topo I inhibition by CPT [80]. Indeed, CSB but not XPC protein, is still necessary for this processing, indicating that paused transcription complexes may trigger TCR-NER factors [80], in accordance with previously mentioned studies demonstrating participation in response to CPT [73, 74]. Considering the results in response to topo I-DNA complexes [73, 74, 76, 77, 80] and some of the studies previously cited, which show high sensitivity of NER-deficient cells (XPG, FEN1, XPA, ERCC1) to TOP-53 and etoposide [42, 45], we cannot exclude the possibility that these NER factors can act in the removal of topo II-DNA complexes, and not necessarily via canonical repair pathways. In addition, an increase in DOX resistance of XPD cells silenced for topo II [67] and also the role of the CSB

protein in the resolution of MXT-induced complexes [72] indicate that these proteins could be involved in the repair of lesions induced by topo II blockage during transcription. Taking into account the sensitivity of endonucleases XPG and ERCC1 to topo II inhibitors [42, 75], we can also suggest that these endonucleases may provide an alternative to TDP2/NHEJ pathways. Therefore, we cannot neglect the involvement of NER proteins in the processing of topo II-DNA complexes and more studies should be conducted to better clarify their role either in the canonical or in alternative pathways.

6. Conclusions

This review highlights the involvement of DNA repair pathways in cellular response to treatment with topo II inhibitors, focusing mainly on topo II poisons (Table 1). The role of DSB repair pathways in the repair of DNA damage induced by these drugs is well established [39 - 45]. However, their association with other DNA repair pathways involved in this process is still not understood. In an attempt to summarize the possible implications of NER machinery in processing some types of lesions induced by topo II poisons, we represent in Fig. 4 a schematic model for this interaction. We suggest that in response to DNA-adducts formed by anthracyclines and MXT, NER proteins like XPA, XPC, XPB, XPD, CSB and probably XPV can be involved in a classical NER pathway for repair of these lesions [65, 67, 69, 70, 72]. On the other hand, topo II-DNA complexes formed during transcription may need the recruitment of the CSB protein to start the processing of lesions, as verified in response to MXT-induced complexes [72]. Other NER proteins like XPD, XPG, XPA, XPG and

XPF-ERCC1 could be involved in repair of these complexes [42, 45, 75], which can also be repaired by action of TDP2/NHEJ or endonucleases/HR pathways [38, 42, 47], and therefore, the question whether these pathways are interconnected still needs to be answered. More studies on a possible involvement of the NER pathway in response to topo II-inhibitors are necessary and will be of great importance since repair mechanisms could modulate the response to therapy and determine the success or failure of cancer treatment.

Table 1: Topoisomerase II Inhibitors type poisons and their relation with DNA repair pathways involved in the removal of drug-induced lesions.

Drug	Kinds of lesions	DNA Repair Pathway Involved	References
Etoposide	Topo II-DNA complexes, strand breaks	NHEJ, HR, NER, TLS	(33, 39, 40, 42, 44, 68)
TP-53	Topo II-DNA complexes, strand breaks	HR, NER	(45)
Doxorubicin	Topo II-DNA complexes, strand breaks, ICL, adducts, ROS	NHEJ, HR, NER, TLS	(41, 42, 65, 67, 69, 70)
Mitoxantrone	Topo II-DNA complexes, strand breaks, ICL, adducts, ROS	NHEJ, NER	(43, 44, 72)

HR – Homologous Recombination, NER – Nucleotide Excision Repair, NHEJ – Non Homologous End Joining, TLS – Translesion synthesis

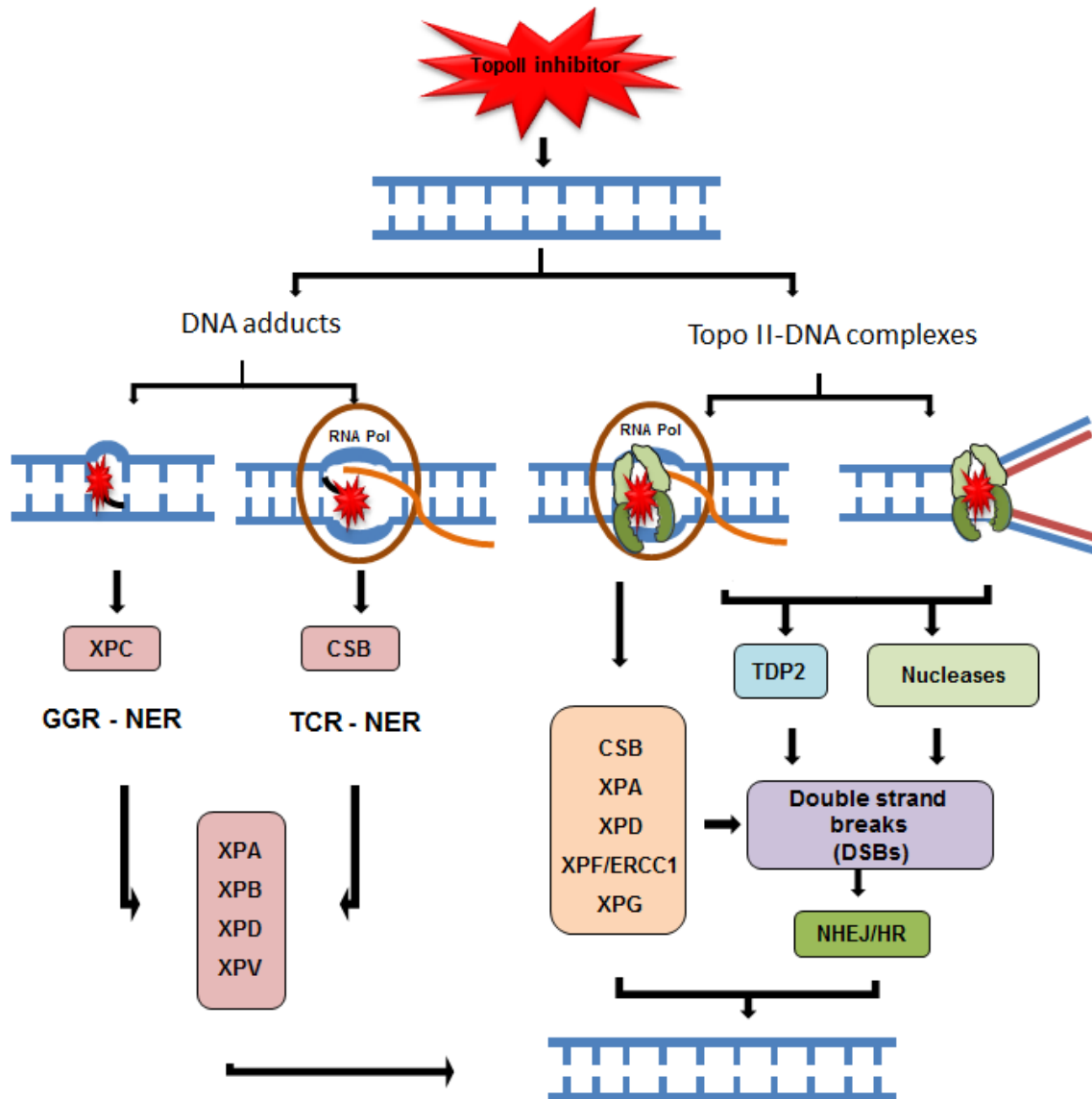


Figure 4: Proposed mechanism for NER interaction with topoisomerase II inhibitors. The induction of lesions like DNA adducts by anthracyclines and mitoxantrone requires a classical NER pathway for their repair, where XPC and CSB proteins are responsible for recognition of lesions in distinct NER sub-pathways and proteins XPD, XPB, XPA and probably XPV are required for further processing of the lesion.

On the other hand, in the resolution of topoisomerase II-DNA complexes generated by topoisomerase II inhibition during transcription, CSB protein could be involved in the initial step to recognize the RNA polymerase blockage. After this, other NER proteins like XPA, XPD, XPG and XPF/ERCC1 could be involved in the processing of DNA damage and the DSBs formed can be repaired by recombinational pathways. Also, the complexes can be removed by TDP2 or nucleases, and the generated DSBs can be repaired by the NHEJ/HR pathways.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the support of the FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil - Grant No. 12/1926-9), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil – Grant No. 479564/2013-2), PRONEX - FAPERGS/CNPq (Grant No. 10/0044-3) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil).

References

- [1] Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol.* 2013;8:82-95.
- [2] Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:340-52.
- [3] Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010;17:443-33.
- [4] Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 2009;39:740–50.

- [5] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:450-42.
- [6] McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res.* 2007;623:83-97.
- [7] Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol.* 2002;157:31-46.
- [8] Linka RM, Porter ACG, Volkov A, Mielke C, Boege F, Christensen MO. C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2007;37:4010-22.
- [9] Rothenberg ML. Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol.* 1997;8:837-55 .
- [10] Pommier Y, Cushman M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8:1008-14.
- [11] Khadka DB, Cho WJ. 3-Arylisoquinolines as novel topoisomerase I inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19:724-34.
- [12] Baldwin E, Osheroff N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005;5:383-72.

- [13] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines : Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56:185-229.
- [14] Blasiak J, Gloc E, Warszawski M. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol.* 2002; 51:147-55.
- [15] Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB.* 2005;57:73-81.
- [16] Skladanovski A, Konopa J. Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity. *Biochem Pharmacol.* 1994;49:2279-87.
- [17] Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjornelund J, Sehested M, Jensen LH. Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology.* 2009; 255: 72-9.
- [18] Chugun A, Uchide T, Tsurimaki C, Nagasawa H, Sasaki T, Ueno S, Takagishi K, Hara Y, Temma K. Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated Guinea-pig heart preparations. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 255-64.

- [19] Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18:1641-44.
- [20] Au WW, Butler MA, Matney TS, Loo TL. Comparative structure-genotoxicity of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. *Cancer Res.* 1981;43:396-9.
- [21] Parker BS, Cutts SM, Cullinane C, Phillips DR. Formaldehyde activation of mitoxantrone yields CpG and CpA specific DNA adducts. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:982-90.
- [22] Skladanovski A, Konopa J. Mitoxantrone and amemantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. *Br J Cancer.* 2000;87:1300-4.
- [23] Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* 2007;252:9-18.
- [24] Bromberg KD, Burgin AB, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II alpha. *J Biol Chem.* 2003;278:7426-12.
- [25] Cowell IG, Austin CA. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to topoisomerase II agents. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9:2075-91.
- [26] Pogorelcnik B, Perdih A, Solmajer T. Recent advances in the development of catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase α as novel anticancer agents. *Curr Med Chem.* 2013;20:694-709.

- [27] Langer SW. Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects. *Cancer Manag Res.* 2014;6:357-63.
- [28] Roca J, Ishida R, Berger Jm, Andoh T, Wang JC. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:1781-5.
- [29] Haiji N, Pastor N, Mateos S, Domínguez I, Cortés F. DNA strand breaks induced by the anti-topoisomerase II bis-dioxopiperazine ICRF-193. *Mutat Res.* 2003;530:35-46.
- [30] Jensen LH, Dejligbjerg M, Hansen LT, Grauslund M, Jensen PB, Sehested M. Characterization of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells. *BMC Pharmacol.* 2004;4:31.
- [31] Swift LP, Cutts SM, Nudelman A, Levovich I, Rephaeli A, Phillips DR. The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzaxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:739-49.
- [32] Soubeyrand S, pope L, Haché RJ. Topoisomerase II alpha-dependent induction of a persistent DNA damage response in response to transient etoposide exposure. *Mol Oncol.* 2010;4:38-51.
- [33] Tammaro M, Barr P, Ricci B, Yan H. Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide. *PLoS One.* 2013;8:e79202.

- [34] Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*. 2009; 481:674-8.
- [35] Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem*. 2001; 276:42652-8.
- [36] Ban Y, Ho CW, Lin RK, Lyu YL, Liu LF. Activation of a novel ubiquitin-independent proteasome pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock. *Mol Cell Biol*. 2013;33:4208-16.
- [37] Gao R, Schellenberg MJ, Huang SY, Abdelmalak M, Marchand C, Nitiss KC, Nitiss JL, Williams RS, Pommier Y. Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2-DNA and Top2-RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *J Biol Chem*. 2014;289:17960-9.
- [38] Nitiss J, Soans E, Berk J, Seth A, Mishina M, Nitiss KC. Repair of topoisomerase II-mediated DNA damage: fixing DNA damage arising from a protein covalently trapped on DNA. In: Pommier Y (Ed.). *DNA Topoisomerases and Cancer*. New York: Springer Human Press; 2012. p. 401-427.
- [39] Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H. Hypersensitivity of nonhomologous end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated damage. *J Biol Chem*. 2003;278:37897-902.

- [40] Despras E, Pfeiffer P, Salles B, Calsou P, Kuhfittig-Kulle S, Angulo JF, Biard DSF. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* 2007;67:2526-34.
- [41] Spencer DMS, Bilardi RA, Koch TH, Post GC, Nafie JW, Kimura K-I, Cutts SM, Phillips DR. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 2008;640:110-21.
- [42] Maede Y, Shimizu H, Fukushima T, Kogame T, Nakamura T, Miki T, Takeda S, Pommier Y, Murai J. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:214-20.
- [43] Elliot SL, Crawford C, Mulligan E, Summerfield G, Newton P, Wallis J, Mainou-Fowler T, Evans P, Bedwell C, Durkaczi BW, Willmore E. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of a DNA-dependent kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2011;152:61-71.
- [44] Abbot DW, Freeman ML, Holt JT. Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:978-85.
- [45] Malik M, Nitiss JL. DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukaryot Cell.* 2004;3:82-90.

- [46] Buerstedde JM, Takeda S. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*. 1991;67:179-88.
- [47] Gómez-Herreros F, Romero-Granados R, Zeng Z, Alvarez-Quilón A, Quintero C, Ju L, Umans L, Vermeire L, Huvlebroeck D, Caldecott KW, Cortés-Ledesma F. TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo. *PLoS Genet*. 2013;9(3):e1003226.
- [48] Gómez-Herreros F, Schuurs-Hoejmakers JH, McCormack M, Grealley MT, Rulten S, Romero-Granados R, Counihan TJ, Chaila E, Conroy J, Ennis S, Cortés-Ledesma F, de Brower AP, Cavalleri GL, El-Khamisy SF, de Vries BB, Caldecott KW. TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nat Genet*. 2014;46:516-21.
- [49] Barret JM, Cadou M, Hill BT. Inhibition of nucleotide excision repair and sensitization of cells to DNA cross-linking anticancer drugs by F 11782, a novel fluorinated epipodophylloid. *Biochem Pharmacol*. 2002;63:251-8.
- [50] Deng S, Yan T, Nikolova T, Fuhrmann D, Nemecek A, Gödtel-Armbrust U, Kaina B, Wojnowski L. The catalytic topoisomerase II inhibitor dexrazoxane induces DNA breaks, ATF3 and the DNA damage response in cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2015;172:2246-57.
- [51] Costa RM, Chigaças V, Galhardo RdaS, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003;85:1083-99.

- [52] Sarasin A, Stary A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:265-9.
- [53] Wood RD. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. *Environ Mol Mutagen*. 2010;526:520-6.
- [54] Shuck SC, Short E, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008;18:64-72.
- [55] Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:958-70.
- [56] Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a012609.
- [57] Kamilleri I, Karakasilioti I, Garinis GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet*. 2012;28:566-73.
- [58] Spivak G, Ganesan AK. The complex choreography of transcription-coupled repair. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:64-70.
- [59] Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:891-937.
- [60] Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:465-81.

- [61] Zhang J, Walter JC. Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 19:137-144.
- [62] Iyama T, Lee SY, Berquist BR, Gileadi O, Bohr VA, Seidman MM, McHugh PJ, Wilson DM 3rd. CSB interacts with SNM1 and promotes DNA interstrand crosslink processing. *Nucleic Acids Res*. 2015; 45:249-58.
- [63] Melis JP, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18:2429-19.
- [64] Le May N, Mota-Fernandes D, Vélez-Cruz R, Iltis I, Biard D, Egly JM. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell*. 2010;40:54-66.
- [65] Furuchi T, Takahashi T, Tanaka S, Nitta K, Naganuma A. Functions of yeast Ssl2p that are essential for viability are also involved in protection from the toxicity of adriamycin. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:2578-85.
- [66] Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama S-I, Popescu N, Kraemer KH, Pommier Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 745 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med*. 2001;7:961-9.
- [67] Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LFZ, Carvalho H, Henriques JAP, Stary A, Menck CFM, Sarasin A. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9:42-7.

- [68] Kuptsova-Clarkson N, Ambrosone CB, Weiss J, Baer MR, Sucheston LE, Zirpoli G, Kopecky KJ, Ford L, Blanco J, Wetzler M, Moysich KB. XPD DNA nucleotide excision repair gene polymorphisms associated with DNA repair deficiency predict better treatment outcomes in secondary acute myeloid leukemia. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2010;1:278-94.
- [69] Carvalho H, Garrido LM, Furlan RL, Padilla G, Agnoletto M, Guecheva T, et al., DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65:989-94.
- [70] Moraes MCS, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JAP, Saffi J, Menck CFM. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett.* 2012;314:108-18.
- [71] Auclair Y, Rouget R, Belisle JM, Costantin S, Drobetsky EA. Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. *DNA Repair (Amst).* 2010;9:754-64.
- [72] Rocha JC, Busatto FF, Souza LK, Saffi J. Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity. *DNA Repair. In press.*
- [73] Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brooks PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex. *Genes Cells.* 2011;16:101-14.

[74] Sakai A, Sakasai R, Kakeji Y, Kitao H, Maehara Y. PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks. *Genes Genet Syst.* 2012;87:265-72.

[75] Tsai MS, Weng SH, Chen HJ, Chiu YF, Huang YC, Tseng SC, Kuo YH, lin YW. Inhibition of p38 MAPK-dependent excision repair cross-complementing 1 expression decreases the DNA repair capacity to sensitize lung cancer cells to etoposide. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:561-71.

[76] Zhang YW, regairaz M, Seiler JA, Agama KK, Doroshov JH, Pommier Y. poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2011;29:3607-20.

[77] Takahata C, Masuda Y, Takedachi A, Tanaka K, Iwai S, Kuraoka I. Repair synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex. *Carcinogenesis.* 2015;36:841-51.

[78] Barret J, Hill BT, Olive PL. Characterization of DNA-strand breakage induced in V79 cells by F 11782, a catalytic inhibitor of topoisomerases. *Br J Cancer.* 2000;83:1740-6.

[79] Kruczynski A, Barret JM, Van Hille B, Chansard N, Astruc J, Menon Y, Duchier C, Créancier L, Hill BT. Decreased nucleotide excision repair activity and alteration of topoisomerase II alpha are associated with the in vivo resistance of a P388 leukemia subline to F11782, a novel catalytic inhibitor of topoisomerase I and II. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3156-68.

[80] Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aquilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell*. 2014;56:777-85.

5. Discussão Geral

Na luta contra o câncer, além da série de problemas enfrentados, relacionados à doença por si própria, como fatores psicológicos ou debilitantes para o paciente, outro grande problema se sobressai: a possibilidade de resistência dos tumores ao tratamento quimioterápico. Embora diversos mecanismos moleculares estejam implicados na resistência às drogas, o crescente conhecimento da biologia molecular do câncer tem permitido o desenvolvimento ou uso de drogas que atuam sobre alterações específicas de diferentes tumores. Entre estes diferentes mecanismos, que podem estar relacionados à inativação ou alterações no efluxo das drogas, modificações epigenéticas, alterações nos alvos das drogas e inibição da morte celular, ainda é possível citar o reparo dos danos ao DNA ocasionados pelas drogas [revisado por Holohan et al., 2013]. Apesar do reparo de danos ao DNA ser um mecanismo protetor para as células normais, impedindo a permanência de lesões que poderiam levar a morte celular ou indução de mutações, em células tumorais este mecanismo geralmente apresenta efeitos contrários, removendo as lesões que seriam responsáveis pela morte celular, diminuindo a eficácia dos tratamentos.

Entre os diferentes mecanismos de reparo de danos ao DNA, dois merecem destaque: o reparo de DSB (via HR ou NHEJ), devido à alta toxicidade destas lesões para as células; e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), devido a sua versatilidade em reparar uma gama de lesões, incluindo as induzidas pelas radiações ultravioletas ou poluentes ambientais aos quais estamos expostos diariamente. Diversos quimioterápicos têm como mecanismo de ação a formação de lesões do tipo DSB, adutos volumosos ou pontes intra- ou -intercadeias de DNA, as quais podem ser reparadas pela ação destas vias. Assim, uma das estratégias dos tumores consiste em utilizar estes mecanismos de reparo como alternativas para a sua sobrevivência. Desta forma, a atividade diminuída, bem como a inibição das vias de reparo destes danos ao DNA pode potencializar a eficácia ou a especificidade de certos agentes antitumorais.

As drogas inibidoras da topoisomerase II constituem um grupo bastante importante de drogas quimioterápicas, sendo utilizadas para tratamento de uma diversidade de tumores, tanto sólidos quanto hematológicos, tanto adultos quanto

pediátricos. O envenenamento da Topo II por estas drogas é o principal determinante da sua atividade, sendo a inibição catalítica da enzima menos importante, visto que tumores com expressão reduzida da Topo II apresentam uma menor sensibilidade a estas drogas [revisado por Pommier, 2013]. Embora o mecanismo de ação destas drogas seja principalmente o envenenamento da Topo II, com a formação dos complexos cliváveis Topo II-DNA estando diretamente ligada à morte celular, alguns inibidores como as antraciclina também são capazes de formar diferentes lesões no DNA das células, como adutos, ICL e ERO [revisado por Minotti et al., 2004]. Já a MXT é um análogo das antraciclina pertencente à classe das antracenodionas, que possui uma estrutura planar que permite sua intercalação entre os pares de bases do DNA e assim como a DOX, também gera adutos no DNA, ICL e ERO [Parker et al., 2000; Skladanovski & Konopa, 2000; Blasiak et al., 2002]. Considerando a variedade de lesões que podem ser induzidas por estas drogas, pode-se considerar que diferentes mecanismos de reparo de danos ao DNA possam estar envolvidos na remoção destas lesões, influenciando as respostas ao tratamento.

No trabalho apresentado no Capítulo I, células proficientes ou deficientes em proteínas da via NER foram tratadas com MXT e algumas respostas celulares como viabilidade celular, danos ao DNA, alterações no ciclo celular, formação de ERO e complexos Topo II-DNA foram analisadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da via NER na citotoxicidade da MXT, buscando uma possível relação desta via com a resistência das células ao tratamento.

A sensibilidade de células deficientes em proteínas da via NER em relação a outras drogas inibidoras da Topo II já havia sido demonstrado anteriormente. Nos trabalhos de Saffi et al., [2010] e Moraes et al., [2012], fibroblastos humanos deficientes nas proteínas XPD e XPA, respectivamente, apresentaram elevada sensibilidade a DOX, assim como células tratadas com doses mais baixas que as utilizadas nestes trabalhos anteriores [de Souza, 2014]. Além disso, em resposta à antraciclina cosmomicina D, células deficientes em XPA e XPC, também apresentaram elevados índices de apoptose [Carvalho et al., 2010]. Embora a via NER esteja relacionada à remoção de adutos no DNA, Spencer e colaboradores [2008] observaram que o tratamento com derivados da DOX com alta capacidade de formação de adutos não aumentava a sensibilidade de células deficientes em proteínas da via NER. Da mesma forma, no trabalho de Maede e

colaboradores [2014] foi observado que células deficientes na proteína XPA apresentavam certa resistência a DOX. Apesar destes resultados contraditórios, pode-se levar em consideração que nestes últimos trabalhos foram utilizados diferentes modelos experimentais (células de roedores ou de galinha) e diferentes tempos de tratamento, o que pode contribuir para as diferenças observadas. Além disso, apesar das deficiências na via NER estarem geralmente associadas a uma maior sensibilidade, esta não é uma regra, uma vez que certas drogas dependem da via NER para exercer sua toxicidade, como nos casos da ecteinascidina [Takebayashi et al., 2001] e do irifulven [Koeppel et al., 2004].

Os resultados obtidos no Capítulo I demonstraram que o tratamento com MXT diminuiu significativamente a viabilidade de células deficientes nas proteínas XPA, XPD, CSB e XPC, comparado à viabilidade de células proficientes em reparo (Figura 1A, B e C). Nossos resultados também demonstraram que células deficientes na proteína CSB (subvia TCR) têm uma sensibilidade mais pronunciada em resposta a MXT e também ao ETO comparado às células proficientes ou deficientes na proteína XPC (subvia GGR) (Figura 1D e E). Diferente das antraciclinas e da MXT, que podem formar diferentes lesões no DNA, o ETO é um inibidor da Topo II cujo mecanismo de ação é baseado primariamente na formação dos complexos Topo II-DNA [Bromberg et al., 2003; Baldwin & Osheroff, 2005]. Estes resultados iniciais indicaram que além do possível envolvimento da via NER na resposta a MXT, as subvias poderiam ter papéis diferenciados na resposta a inibidores da Topo II. Em adição a elevada sensibilidade a MXT, a alta taxa de morte das células deficientes foi relacionada principalmente a apoptose (Figura 1H).

A indução de apoptose é um importante mecanismo protetor para células normais, eliminando células desnecessárias ou danificadas, mantendo a homeostasia do organismo. Desta forma, células com danos no seu DNA ativam vias de resposta a danos e desencadeiam a via apoptótica, entre outros mecanismos, a fim de eliminar estas células danificadas e impedir a carcinogênese [Hassan et al., 2014]. Grande parte dos quimioterápicos utilizados atualmente se baseia na indução de danos ao DNA das células, desencadeando o processo de apoptose como estratégia de morte para as células tumorais. Koceva-Chyla et al [2005] demonstraram que a indução de morte pela MXT pode ser via apoptose, porém o mecanismo predominante seria a necrose. Entretanto,

estes estudos foram conduzidos em células de camundongo ou hamster chinês e diferentes respostas em relação à morte via apoptose ou necrose podem ser obtidos pela mesma droga dependendo do tipo celular utilizado [Koceva-Chyla et al., 2005]. A observação de que a MXT induziu morte significativa nas células deficientes já a partir das doses mais baixas e tempos de tratamento mais curtos utilizados, foi um indicativo de que a via NER estaria envolvida na remoção das lesões induzidas pela MXT (Figura 1A, B e C). Considerando que nas primeiras 24 horas após o tratamento a maioria das células ainda permanece viável, nossos resultados estão de acordo com um mecanismo de ação mais lento da MXT, no qual a fragmentação do DNA ocorre somente 36 horas após o tratamento e a indução de apoptose não é observada antes de 48 horas [Koceva-Chyla et al., 2005].

Em resposta aos danos ao DNA, notavelmente DSB, diversas proteínas são ativadas, desencadeando uma cascata sinalizadora para diferentes vias associadas à progressão do ciclo celular, reparo de danos ao DNA, apoptose ou senescência. Uma das principais respostas celulares a formação de uma DSB é a ativação da proteína ATM pela ação do complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), sendo então capaz de fosforilar diversos substratos, como p53, H2AX, Chk1 e Chk2, entre outros [Bakkenist & Kastan, 2004]. A indução de danos ao DNA após tratamento com MXT é observado a partir de doses na faixa de nanomolar, principalmente através da formação de DSB [Smart et al., 2008], com concomitante ativação da proteína H2AX [Huang et al., 2004, Huang et al., 2006, Smart et al., 2008]. A indução de γ -H2AX e ativação de ATM pela MXT são aparentes em todas as fases do ciclo celular, porém mais elevados em G1, enquanto a indução de Chk2 e a ativação de p53 apresentam níveis semelhantes em todas as fases do ciclo celular [Zhao et al., 2008]. Embora a fosforilação de H2AX esteja geralmente associada à formação de DSB, diversos outros processos também podem levar a sua ativação, como pela ação da proteína ATR em resposta a SSB geradas durante o estresse replicativo [Ward & Chen, 2001], assim como pelos intermediários do reparo pela via NER em resposta a radiação UV, e não necessariamente pela formação de DSB [Marti et al., 2006, Hanasoge & Ljungman, 2007]. Os resultados do capítulo I demonstraram que a indução de danos ao DNA após o tratamento com MXT, bem como o reparo destes danos, ocorre de forma semelhante e dose-dependente entre as células (Figura 2A e B). Entretanto, ocorre uma indução mais

forte de γ -H2AX 24 horas após o tratamento, indicando que o processamento das lesões remanescentes (seja via reparo ou indução de mais danos) pode estar relacionado a este aumento (Figura 2C e D). Os níveis mais altos de fosforilação de H2AX pela MXT durante a fase G1 poderiam ser resultantes das colisões dos complexos Topo II-DNA com a RNA polimerase [Huang et al., 2004, Huang et al., 2006, Potter & Rabinovitch, 2005, Zhao et al., 2008]. Desta forma, a pequena diferença observada na indução de γ -H2AX entre as células XPC e CSB seria mais um indicativo de que a resposta a MXT poderia ser diferente entre as subvias do NER.

Os danos ao DNA afetam funções celulares como a proliferação e a ativação das proteínas de resposta a estes danos desencadeiam uma série de eventos que resultam na ativação dos pontos de checagem e subsequente parada do ciclo celular, permitindo que as células tenham tempo para reparar estes danos [Shaltiel et al., 2015]. As alterações no ciclo celular em resposta a inibidores da Topo II como as antraciclinas (especialmente a DOX), são caracterizadas por um aumento do percentual de células na fases G2/M [Potter & Rabinovitch, 2005, Saffi et al., 2010, Moraes et al., 2012], enquanto em resposta à MXT, além do aumento em G2/M, também ocorre aumento de células na fase S [Potter & Rabinovitch, 2005]. As diferenças observadas no perfil de ciclo celular entre as células deficientes nas subvias TCR e GGR (Figura 3A) reforçam a ideia de que diferentes respostas são desencadeadas dependendo da fase na qual o dano foi gerado. Além disso, a diminuição na síntese de DNA nas células CSB (Figura 3B) poderia estar relacionada à falha no reconhecimento dos danos durante a transcrição e atraso na progressão das fases G1/S. Embora a MXT cause dano de forma semelhante em todas as fases do ciclo celular, células passando pela fase S são mais propensas a sofrer apoptose [Huang et al., 2004, Huang et al., 2006], enquanto células tratadas com ETO sofrem apoptose preferencialmente na fase G1 [Tanaka et al., 2007]. Apesar da morte celular induzida pelos inibidores da Topo II estar fortemente relacionada às colisões da forquilha de replicação com os complexos Topo II-DNA [Fox & Smith, 1990], estas diferenças podem ser em parte atribuídas ao mecanismo de ação das duas drogas, visto que a MXT, além dos complexos Topo II-DNA também forma outras lesões que poderiam estar desencadeando diferentes respostas celulares.

As ERO são importantes lesões induzidas pelas antraciclinas (e também pela MXT) uma vez que estão relacionadas à cardiotoxicidade destas drogas [Minotti et al.,

2004, Costa et al., 2013]. Huang e colaboradores [2006] sugeriram que a formação de DSB induzidas pela MXT poderia ser mediada por ERO, uma vez que o pré-tratamento das células com N-acetilcisteína diminuía a ativação de proteínas como ATM e γ -H2AX. Mais recentemente, foi demonstrada a formação de ERO após tratamento com MXT por longos períodos, utilizando a diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) como marcador [Rossato et al., 2013b]. Células CSB são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, apresentando elevada citotoxicidade e acúmulo de danos oxidativos no DNA [D'Errico et al., 2013]. Além disso, a proteína CSB pode estar envolvida no reparo de lesões oxidativas juntamente com a via BER [Stevnsner et al., 2008] e na remoção de ERO mitocondriais, mesmo na ausência de dano ao DNA nuclear [Cleaver et al., 2014]. Nossos resultados utilizando a DCF-DA não foram capazes de detectar a formação de ERO nas condições utilizadas neste trabalho (Figura 4), assim como Huang et al., [2006], que utilizaram doses e tempos semelhantes aos nossos. Desta forma, as diferenças observadas entre as células CSB e XPC não estariam relacionadas à formação de ERO.

As lesões características dos inibidores da Topo II são os complexos ternários estabilizados formados pela droga-topoisomerase-DNA (complexos Topo II-DNA), que impedem a reação de religação do fragmento de DNA clivado. A geração de altos níveis destes complexos apresenta grandes efeitos na fisiologia celular, bloqueando efetivamente a replicação e a transcrição do DNA, levando as células frequentemente a apoptose [Nitiss, 2009]. Apesar da sua grande toxicidade, pode ocorrer a dissociação destes complexos após a remoção da droga, indicando a reversibilidade destas lesões [Hsiang & Liu, 1989]. Embora os complexos Topo II-DNA formados pelo ETO sejam observados após curtos tempos de tratamento, os mesmos sofrem rápida dissociação, com os níveis praticamente desaparecendo 2 horas após a remoção da droga [Willmore et al., 1998]. Por outro lado, inibidores como antraciclinas e MXT formam complexos mais estáveis, o que pode ser relacionado à maior potência destas drogas comparada ao ETO [Fox & Smith, 1990; Willmore et al., 2002; Errington et al., 2004]. A indução dos complexos Topo II-DNA pela MXT é observado a partir de doses na faixa de nanomolar, aumentando de forma dose-dependente [Smart et al., 2008], sendo que a dissociação dos mesmos ocorre de forma lenta, com diminuição mais significativa a

partir de 6 horas após remoção da droga e alcançando níveis quase indetectáveis 24 horas após [Errington et al., 2004].

O reparo dos complexos Topo II-DNA requer a remoção da enzima ligada covalentemente ao DNA, bem como o reparo das quebras de cadeia oriundas desta remoção [Nitiss, 2009]. A remoção da Topo II pode ser feita através da ação da proteína Tdp2 ou vias nucleolíticas ou ainda através da degradação da enzima pelo proteassoma. Entretanto, a maneira exata como este processo ocorre, bem como a sua associação com outras vias de reparo de danos ao DNA ainda não está bem determinada [revisado por Pommier et al., 2014]. Nossos resultados demonstraram a indução dos complexos pela MXT de forma dose-dependente, a partir de 2 horas de tratamento (Figura 5A) e quando comparamos a formação dos complexos entre as diferentes linhagens celulares, observamos que as células CSB apresentavam um sinal mais intenso comparado as células proficientes (MRC5) ou deficientes XPC. Mesmo 24 horas após a remoção da droga, células CSB continuavam com sinal mais intenso que as demais células (Figura 5B e C), indicando que a proteína CSB ou a via TCR poderia estar envolvida na remoção destas lesões causadas pela MXT.

Complexos Topo II-DNA bloqueando a RNA polimerase podem desencadear a proteólise da Topo II e também da RNA polimerase [Mao et al., 2001; Ban et al., 2013], sendo que a degradação da Topo II pode ocorrer de uma forma dependente de ubiquitinação pela ação de proteínas como Brca1 [Lou et al., 2005], Mdm2 [Nayak et al., 2007] e Bmi1/Ring1A [Alchanati et al., 2009]. Após dano induzido por radiação UV, células deficientes na proteína CSB são defectivas na ubiquitinação de proteínas como a RNA polimerase [Bregmann et al., 1996] e as proteínas CSA e CSB interagem com p53 estimulando a sua ubiquitinação pela proteína Mdm2 [Latini et al., 2011]. A proteína CSB é também necessária para a formação de foci nucleares da proteína 53BP1 (p53 binding protein 1) em resposta a SSB induzidas pela CPT durante a transcrição [Sakai et al., 2012]. Além disso, células deficientes em CSB são altamente sensíveis a CPT [Squires et al., 1993] e células deficientes em CSB ou células expressando uma forma alterada da proteína, tem o reparo dos complexos TopoI-DNA induzidos pela CPT inibidos, indicando a participação da mesma na resolução destas lesões [Horibata et al., 2011]. Proteínas da via NER (XPA, XPD, XPB, XPG e XPF) são necessárias para processamento de estruturas do tipo R-loops (híbridos RNA-DNA como os formadas

pela ausência de fatores de transcrição ou pela inibição da Topo I) em DSB e além disso, a proteína CSB, mas não a XPC, apresenta papel fundamental neste processo [Sollier et al., 2014]. Os resultados destes trabalhos mostrando a participação da proteína CSB na resposta as lesões do tipo complexos TopoI-DNA associados aos nossos resultados demonstrando a resposta diferenciada das células CSB na formação e reparação dos complexos Topo II-DNA (Figura 5B e C), juntamente com o fato da complementação de células deficientes com a proteína CSB selvagem reverter a sensibilidade a MXT (Figura 6A), bem como diminuir a intensidade da formação dos complexos (Figura 6B), foram mais um indicativo de que a proteína CSB estaria envolvida na remoção dos complexos Topo II-DNA induzidos pela MXT.

Levando em consideração os trabalhos demonstrando a participação da via NER na resposta as antraciclinas [Saffi et al.,2010; Carvalho et al.,2010; Moraes et al.,2012; de Souza, 2014] e nossos resultados obtidos com a MXT, foi elaborado um modelo de como as lesões induzidas pela MXT podem ser reparadas. Neste modelo (Figura 7), lesões do tipo adutos no DNA seriam reparadas pela ação da via NER, considerando a participação das proteínas XPC, CSB, XPA e XPD, com a ausência de uma destas proteínas favorecendo a morte celular. Por outro lado, em resposta a lesões do tipo complexos Topo II-DNA, a proteína CSB estaria envolvida no reconhecimento das lesões para posterior processamento e reparo destas lesões, possivelmente pela ação das vias recombinacionais.

Por fim, no trabalho apresentado no Capítulo II, foi elaborado um artigo de revisão no qual são descritos os mecanismos pelos quais as diferentes lesões induzidas pelos inibidores da Topo II são reparadas. Foi discutido o reparo dos complexos Topo II-DNA, através das vias TDP2, nucleolítica ou degradação proteassomal, bem como a participação de proteínas das vias de reparo de DSB (HR e NHEJ) na resposta a estas drogas. Entretanto, o enfoque principal foi a participação das proteínas da via NER na resposta aos inibidores da Topo II. Nesta revisão, elaboramos um modelo (Figura 4), no qual o reparo de lesões do tipo adutos, induzidos pelas antraciclinas e MXT, ocorreria através da via NER clássica, considerando a participação das proteínas XPC e CSB para o reconhecimento das lesões pelas subvias GGR e TCR, respectivamente, assim como as demais proteínas XPA, XPD e provavelmente XPV, atuando na via comum para garantir a sobrevivência das células. Por outro lado, em resposta aos complexos Topo

II-DNA formados durante a transcrição, a proteína CSB poderia ser necessária para o reconhecimento do bloqueio da RNA polimerase. Ainda poderia ocorrer a participação de outras proteínas da via NER (XPA, XPD, XPG, XPF/ERCC1) no processamento destas lesões, e/ou na geração de DSB, que poderiam ser reparadas pelas vias recombinacionais. O reparo dos complexos ainda poderia ocorrer pelas vias TDP2/NHEJ ou nucleases/HR [Nitiss 2009, Maede et al., 2014, Gómez-Herreros et al., 2013], entretanto, a maneira como estas vias estão interligadas ou se trabalham de maneira independente ainda são questões a serem respondidas.

Os dados obtidos neste trabalho indicam que a via NER é um determinante na citotoxicidade da MXT, de modo que a ausência de proteínas desta via afeta fortemente a viabilidade das células expostas a esta droga. Além disso, estes resultados, juntamente com os demais dados disponíveis na literatura, indicam que a via NER exerce influência também sobre a resposta a outras drogas desta classe, como a DOX e o ETO. Desta forma, o nível de atividade da via NER nos tumores poderia ser um dos fatores determinantes do desfecho do tratamento quimioterápico com inibidores da Topo II, resultando numa maior sensibilidade ou por outro lado, no desenvolvimento de resistência ao tratamento pelos tumores.

6. Conclusões

6.1 Conclusão Geral

Neste trabalho foi possível concluir que a deficiência em proteínas da via NER está associada a uma maior sensibilidade das células ao tratamento com o antineoplásico MXT. Além disso, como as células deficientes apresentam respostas diferenciadas dependendo da subvia envolvida, foi possível elucidar um modelo no qual ocorre a participação da via NER como um todo na remoção de certas lesões, enquanto para a remoção de lesões do tipo complexos Topo II-DNA estaria envolvida somente a subvia associada à transcrição (TCR-NER). Desta forma, concluímos que a via NER pode ser um determinante na citotoxicidade de drogas inibidoras da Topo II e influenciar a resposta dos tumores a quimioterapia, de modo que a baixa atividade da via resultaria numa melhor resposta ao tratamento e a atividade aumentada poderia estar relacionada ao desenvolvimento de resistência ao tratamento.

6.2 Conclusões Específicas

- Células deficientes em proteínas da via NER apresentam elevada sensibilidade a MXT.
- Células deficientes na subvia TCR-NER apresentam maior sensibilidade a MXT e ao ETO.
- Células deficientes nas diferentes subvias apresentam perfis diferentes de ciclo celular e síntese de DNA.
- As doses de MXT e os tempos de tratamentos utilizados não induzem formação de espécies reativas de oxigênio.

- Células deficientes na subvia TCR-NER (CSB) apresentam sinal mais intenso para a formação e reparação dos complexos Topo II-DNA.
- A complementação das células CSB com a proteína CSB recupera a resistência a MXT e diminui o sinal de formação dos complexos Topo II-DNA.
- As proteínas XPC, CSB, XPA e XPD estão envolvidas na remoção de lesões do tipo adutos induzidas pela MXT.
- A proteína CSB participa do processamento de lesões do tipo complexos Topo II-DNA.

7. Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a importância da via NER na modulação da toxicidade induzida pelo antineoplásico mitoxantrona. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as células utilizam esta via para reparar as lesões induzidas por esta droga e também por outros inibidores da Topo II ainda precisa ser elucidado. Estudos recentes demonstram a participação de proteínas da via NER na resposta a inibidores da Topo II e também no processamento dos complexos induzidos por inibidores da Topo I. Além disso, apesar do conhecimento sobre a participação da proteína TDP2 e outras nucleases na remoção das lesões do tipo complexos Topo II-DNA, a interação destas com outras vias de reparo além do reparo de quebras duplas ainda não é conhecida. Por estes motivos, surgiram algumas questões durante o desenvolvimento desta tese e desta forma pretende-se:

- Avaliar a formação e reparação dos complexos Topo II-DNA em células deficientes em proteínas da via comum (GGR e TCR).
- Verificar a co-localização da proteína CSB com a proteína Topo II.
- Analisar a ubiquitinação das proteínas Topo II e RNA Pol e o perfil de degradação da Topo II em células proficientes e deficientes na via NER.
- Analisar a expressão da proteína TDP2 em células proficientes e deficientes na via NER.
- Silenciar genes da via NER e TDP2 em células tumorais e avaliar a resposta ao tratamento com mitoxantrona e outros inibidores da Topo II, como DOX e ETO.
- Analisar a formação e reparação dos complexos em resposta a outros inibidores da Topo II.

8. Referências

Aaman MD, Sorensen MM, Hyitby C, Berguist BR, Muftuoglu M, Tian J, de Souza-Pinto NC, Scheibye-Knudsen M, Wilson DM 3rd, Stevnsner T, Bohr VA. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *FASEB J* 24(7):2334-46. 2010.

Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem* 278(38):35897-902. 2003.

Alchanati I, Teicher C, Cohen G, Shemesh V, Barr H, Nakache P, Ben-Avraham D, Idelevich A, Angel I, Livnah N, Tuvia S, Reiss Y, Taglicht D, Erez O. The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Topo2alpha cleavage complex – a potentially new drug target. *PLoS One* 4(12):e8104. 2009.

Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5(12):943-55. 2005.

Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10(5):891-937, 2008.

Ashour ME, Atteva R, El-Khamisy SE. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat Rev Cancer* 15(3):137-51. 2015.

Au WW, Butler MA, Matney TS, Loo TL. Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. *Cancer Res* 41(2):376-9. 1981.

Azarova AM, Lyu YL, Lin CP, Lau JY, Wang JC, Liu LF. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26):11014-9. 2007.

Bakkenist CJ, Kastan MB. Initiating cellular stress responses. *Cell* 118(1):9-17. 2004.

Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5(4):363-72. 2005.

Ban Y, Ho CW, Lin RK, Lyu YL, Liu LF. Activation of a novel ubiquitin-independent pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock. *Mol Cell Biol* 33(20):4008-16. 2013.

Blasiak J, Gloc E, Warszawski M. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol* 51(1):147-55. 2002.

Bowden NA. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy. *Cancer Lett* 346(2):163-71. 2014.

Bregman DB, Halaban R, van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, Warren SL. UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21):11586-90. 1996.

Bridge G, Rashid S, Martin SA. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. *Cancers (Basel)* 6(3):1597-614. 2014.

Bromberg KD, Burgin AB, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II- α . *J Biol Chem* 278(9):7406-12. 2003.

Capobianco M, Maluchi S, Ulisciani S, Fava C, Cambrin GR, Avonto L, Saglio G, Bertolotto A. Acute myeloid leukemia induced by mitoxantrone treatment for aggressive multiple sclerosis. *Neurol Sci* 29(3):185-7. 2008.

Carvalho H, Garrido LM, Furlan RL, Padilla G, Agnoletto M, Guecheva T, Henriques JA, Saffi J, Menck CF. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 65(5):989-94. 2010.

Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war of cancer. *Nat Rev Cancer* 5(1):65-72. 2005.

Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol* 20(5):648-59. 2013.

Chugun A, Uchide T, Tsurimaki C, Nagasawa H, Sasaki T, Ueno S, Takagishi K, Hara Y, Temma K. Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated Guinea-pig heart preparations. *J Vet Med Sci* 70(3): 255-64. 2008.

Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40(2): 179-204. 2010.

Cleaver JE, Brennan-Minnella AM, Swanson RA, Fong KW, Chen J, Chou KM, Chen YW, Revet I, Bezrookove V. Mitochondrial reactive oxygen species are scavenged by Cockayne syndrome B protein in human fibroblasts without nuclear DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(37):13487-92. 2014.

Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Res* 36(16):e100.doi:10.1093/nar/gkn439. 2008.

Cortés-Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. A human 5'-tyrosil DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* 461(7264):674-8. 2009.

Costa RM, Chiganças V, Galhardo RdaS, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083-99. 2003.

Costa VM, Carvalho F, Duarte JA, Bastos Mde L, Remião F. The heart as a target for xenobiotic toxicity: the cardiac susceptibility to oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 26(9):1285-311. 2013.

Cowell IG, Austin CA. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *Int J Environ Res Public Health* 9(6):2075-91. 2012.

Crespi MD, Ivanier SE, Genovese J, Baldi A. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136(2):521-8. 1986.

- Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12(12):801-17. 2012.
- Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* 57(2):73-81. 2005.
- D'Errico M, Pascucci B, Iorio E, Van Houten B, Dogliotti E. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. *Mech Ageing Dev* 134(5-6):261-9. 2013.
- de Souza, LM. Avaliação da indução de autofagia e senescência em fibroblastos humanos deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos tratados com doxorubicina. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.
- Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11(7):467-80. 2011.
- Despras E, Pfeiffer P, Salles B, Calsou P, Kuhfittig-Kulle S, Angulo JF, Biard DS. Long-term XPC silencing reduces DNA double strand break repair. *Cancer Res* 67(6):2526-34. 2007.
- Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* 37(3):738-48. 2009.
- Elliot SL, Crawford C, Mulligan E, Summerfield G, Newton P, Wallis J, Mainou-Fowler T, Evans P, Bedwell C, Durkacz BW, Willmore E. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 152(1):61-71. 2011.
- Enoiu M, Jiricny J, Schärer OD. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Res* 40(18):8953-64. 2012.
- Errington F, Willmore E, Leontiou C, Tilby MJ, Austin CA. Differences in the longevity of topo IIalpha and topo IIbeta drug-stabilized cleavable complexes and the relation to drug sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):155-62. 2004.

Ewald B, Sampath D, Plunkett W. Nucleoside analogs: molecular mechanism signaling cell death. *Oncogene* 27(50):6522-37. 2008.

Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 93(4):571-6. 2001.

Fenu G, Loreface L, Frau F, Coghe GC, Marrosu MG, Cocco E. Induction and escalation therapies in multiple sclerosis. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 14(1):26-34. 2015.

Fox ME, Smith PJ. Long-term inhibition of DNA synthesis and the persistence of trapped topoisomerase II complexes in determining the toxicity of the antitumor DNNA intercalators mAMSA and mitoxantrone. *Cancer Res* 50(18):5813-8. 1990.

Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* 12(2):104-20. 2012.

Gao R, Schellenberg MJ, Huang SY, Abdelmalak M, Marchand C, Nitiss KC, Nitiss JL, Williams RS, Pommier Y. Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2-DNA and Top2-RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *J Biol Chem* 289(26):17960-9. 2014.

Glisson B, Gupta R, Hodges P, Ross W. Cross-resistance to intercalating agents in an epipodophyllotoxin-resistant Chinese hamster ovary cell line: evidence for a common intracellular target. *Cancer Res* 46(4Pt2):1939-42. 1986

Gómez-Herreros F, Romero-Granados R, Zeng Z, Alvarez-Quilón A, Quintero C, Ju L, Umans L, Vermeire L, Huvlebroeck D, Caldecott KW, Cortes-Ledesma F. TDP2-dependent non-homologous end-joinig protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo. *PLoS Genet* 9(3):e1003226. 2013.

Gordaliza M, Garcia PA, del Corral JM, Castro MA, Gómez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicol* 44(4):441-59. 2004.

- Guo J, Hanawalt PC, Spivak G. Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. *Nucleic Acids Res* 41(16):7700-12. 2013.
- Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 28(11):2298-304. 2007.
- Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 544(2-3):107-14. 2003.
- Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12):958-70. 2008.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014:150845. 2014.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8(3):193-204. 2008.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging and cancer. *N Engl J Med* 361(15):1475-85. 2009.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13(10):714-26. 2013.
- Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brooks PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex. *Genes Cells* 16(1):101-14. 2011.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)* 6(3):1769-92. 2014.
- Hsiang YH, Liu LF. Evidence for the reversibility of cellular DNA lesion induced by mammalian topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 264(17):9713-5. 1989.

Huang X, Kurose A, Tanaka T, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z. Activation of ATM and histone H2AX phosphorylation induced by itoxantrone but not topotecan is prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Biol Ther* 5(8):959-64. 2006.

Huang X, Okafugi M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A* 58(2):99-110. 2004.

Huang Y, Li L. DNA crosslinking damage and cancer – a tale of friend and foe. *Transl Cancer Res* 2(3):144-154. 2013.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/>. Acesso em 14 de julho de 2015.

Iyama T, Lee SY, Bergquist BR, Gileadi O, Bohr VA, Seidman MM, McHugh PJ, Wilson DM 3rd. CSB interacts with SNM1A and promotes DNA interstrand crosslink processing.

Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploration. *Br J Cancer* 105(8):1114-22. 2011.

Kamileri I, Karakasilioti I, Garinis GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet* 28(11):566-73. 2012.

Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol* 10(7):1215-37. 2014.

Klein Douwel D, Boonen RA, Long DT, Szypowska AA, Räschle M, Walter JC, Knipscheer P. XPF-ERCC1 acts in unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. *Mol Cell* 54(3):460-71. 2014.

Koceva-Chyla A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K, Józwiak Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 10(6):1497-514. 2005.

Koeppel F, Poindessous V, Lazar V, Raymond E, Sarasin A, Larsen Ak. Irofulven cytotoxicity depends on transcription-coupled nucleotide excision repair and is correlated with XPG expression in solid tumor cells. *Clin Cancer Res* 10(16):5604-13. 2004.

Latini P, Frontini M, Caputo M, Gregan J, Cipak L, Filippi S, Kumar V, Vélez-Crus R, Stefanini M, Progetti-De-Santis L. CSA and CSB proteins Interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* 10(21):3719-30. 2011.

Le May N, Egly JM, Coin F. True lies: the double life of nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J Nucleic Acids* Jul 25:2010. 2010.

Lee KC, Padget K, Curtis H, Cowell IG, Moiani D, Sondka Z, Morris NJ, Jackson GH, Cockell SJ, Tainer JA, Austin CA. MRE11 facilitates the removal of human topoisomerase II complexes from genomic DNA. *Biol Open* 1(9):863-73. 2012.

Lord CJ, Ashwort A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481(7381):287-94. 2012.

Lou Z, Minter-Dykhous K, Chen J. BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol* 12(7):589-93. 2005.

Lown JW, Hanstock CC, Bradley RD, Scraba DG. Interactions of the antitumour agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy. *Mol Pharmacol* 25(1):178-84. 1984.

Maede Y, Shimizu H, Fukushima T, Kogame T, Nakamura T, Miki T, Takeda S, Pommier Y, Murai J. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. *Mol Cancer Ther* 13(1):214-20. 2014.

Malik M, Nitiss JL. DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukariot Cell* 3(1):82-90. 2004.

Manandhar M, Boulware KS, Wood RD. The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products. *Gene* 569(2):153-61. 2015.

- Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* 276(44):40652-8. 2001.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 7(10):1765-71. 2008.
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoejmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(7):465-81. 2014.
- Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):9891-6. 2006.
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjornelund J, Sehested M, Jensen LH. Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* 255(1-2):72-9. 2009.
- McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 623(1-2):83-97. 2007.
- McGurk CJ, Cummings M, Köberle B, Hartley JA, Oliver RT, Masters JR. Regulation of DNA repair gene expression in human cancer cell lines. *J Cell Biochem* 97(5):1121-36. 2006.
- Melis JP, Luijten M, Mullenders LH, van Steeg H. The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutat Res* 728(3):107-17. 2011.
- Menoni H, Hoejmakers JH, Vermeulen W. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo. *J Cell Biol* 199(7):1037-46. 2012.
- Micromedex® 2.0, (electronic version). Truven Health Analytics, Greenwood Village, Colorado, USA. Disponível em: <http://www-micromedexsolutions-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/>. Acesso em 20 de julho de 2015.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines : Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56(2):185-229. 2004.

Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, Parry A, Walz C, Wiemels JL, Segal MR, Ades L, Blair IA, Osheroff N, Peniket AJ, Lafage-Pochitaloff M, Cross NC, Chomienne C, Solomon E, Fenaux P, Grimwade D. DNA topoisomerase II in therapy-related acute Promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 352(15):1529-38. 2005.

Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 252:9-18. 2007.

Moraes MC, de Andrade AQ, carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JA, Sarasin A, Stary A, Saffi J, Menck CF. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett* 314(1):108-18. 2012.

Munck JM, Batey MA, Zhao Y, Jenkins H, Richardson CJ, Cano C, Tavecchio M, Barbeau J, Bardos J, Cornell L, Griffin RJ, Menear K, Slade A, Thommes P, Martin NM, Newell DR, Smith GC, Curtin NJ. Chemosensitization of cancer cells by KU-0060648, a dual inhibitor of DNA-PK and PI-3K. *Mol Cancer Ther* 11(8):1789-98. 2012.

Nayak MS, Yang JM, Hait WN. Effect of a single nucleotide polymorphism in the murine double minute 2 promoter (SNP309) on the sensitivity to topoisomerase II-targeting drugs. *Cancer Res* 67(12):5831-9. 2007.

Neto MC. *Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia* 2013. 1ª Ed. São Paulo, Hospital Albert Einstein. 2013.

Nitiss JL, Nitiss KC. Tdp2: a means to fixing ends. *PLoS Genet* 9(3):e1003370. 2013.

Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9:340-52. 2009.

- Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66(6):994-1009. 2009.
- Novak RF, Kharasch ED. Mitoxantrone: propensity for free radical formation and lipid peroxidation – implications for cardiotoxicity. *Invest New Drugs* 3(2):95-9. 1985.
- Panousis C, Phillips DR. DNA sequence specificity of mitoxantrone. *Nucleic Acids Res* 22(8):1342-5. 1994.
- Parker BS, Cullinane C, Phillips DR. Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. *Nucleic Acids Res* 27(14):2918-23. 1999.
- Parker BS, Cutts SM, Cullinane C, Phillips DR. Formaldehyde activation of mitoxantrone yields CpG and CpA specific DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 28(4):982-90. 2000.
- Pendentlon M, Lindsey RH Jr, Felix CA, Grimwade D, Osheroff N. Topoisomerase II and leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1310:98-110. 2014.
- Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, Sordet O, Jobson AG, Thibaut L, Miao ZH, Seiler JA, Zhang H, Marchand C, Agama K, Nitiss JL, Redon C. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81:179-229. 2006.
- Pommier Y, Huang SY, Gao R, Das BB, Murai J, Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst)* 19:114-29. 2014.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17:443-33. 2010.
- Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* 109(7):2894-902. 2009.
- Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol* 8(1):82-95. 2013.
- Potter AJ, Rabinovitch PS. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res* 572(1-2):27-44. 2005.

Pougliot JJ, Yao KC, Robertson CA, Nash HA. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* 286(5439):552-5. 1999.

Rossato LG, Costa VM, de Pinho PG, Arbo MD, de Freitas V, Vilain L, de Lourdes Bastos M, Palmeira C, Remião F. The metabolic profile of mitoxantrone and its relation with mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol* 87(10):1809-20. 2013a.

Rossato LG, Costa VM, Vilas-Boas V, de Lourdes Bastos M, Rolo A, Palmeira C, Remião F. Therapeutic concentrations of mitoxantrone elicit energetic imbalance in H9c2 as an earlier event. *Cardiovasc Toxicol* 13(4):413-25. 2013b.

Safa AR, Tseng MT. Inhibition of protein synthesis and cell proliferation in cultured human breast cancer cells treated with mitoxantrone. *Cancer Lett* 24(3):317-26. 1984.

Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LF, Carvalho H, Henriques JA, Sary A, Menck CF, Sarasin A. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)* 9(1):40-7. 2010.

Sakai A, Sakasai R, Kakeji Y, Kitao H, Maehara Y. PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks. *Genes Genet Syst* 87(4):265-72. 2012.

Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a012609. 2013.

Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different – DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* 128(4):607-20. 2015.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18(1):134-47. 2008.

Shuck SC, Short E, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18(1):64-72. 2008.

Skladanovski A, Konopa J. Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity. *Biochem Pharmacol* 47(12):2279-87. 1994.

Skladanowski A, Konopa J. Mitoxantrone and ametantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. *Br J Cancer* 82(7):1300-4. 2000.

Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res* 641(1-2):43-7. 2008.

Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aquilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell* 56(6):777-85. 2014.

Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, Post GC, Nafie JW, Kimura K, Cutts SM, Phillips DR. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res* 638(1-2):110-21. 2008.

Spivak G, Ganesan AK. The complex choreography of transcription-coupled repair. *DNA Repair (Amst)* 19:64-70. 2014

Squires S, Ryan AJ, Strutt HL, Johnson RT. Hypersensitivity of Cockayne's syndrome cells to camptothecin is associated with the generation of abnormally high levels of double strand breaks in nascent DNA. *Cancer Res* 53(9):2012-9. 1993.

Stevnsner T, Muftuoglu M, Aamann MD, Bohr VA. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech Ageing Dev* 129(7-8):441-8. 2008.

Stevnsner T, Nyaga S, de Souza-Pinto NC, van der Horst GT, Gorgels TG, Hoque BA, Thorslund T, Bohr VA. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 21(57):8675-82. 2002.

Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama SI, Popescu N, Kraemer KH, Pommier Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 7(8):961-6. 2001.

Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Seiter K, Darzynkiewicz Z. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle* 6(3):371-6. 2007.

Tarasiuk J, Mazerski J, Tkaczyk-Gobis K, Borowski E. Molecular basis of the low activity of antitumor anthracenediones mitoxantrone and ametantrone in oxygen radical generation catalyzed by NADH dehydrogenase. Enzymatic and molecular modeling studies. *Eur J Med Chem* 40(4):321-8. 2005.

Thordnike J, Beck WS. Production of formaldehyde from N5-methyltetrahydrofolate by normal and leukemic leukocytes. *Cancer Res* 37(4):1125-32. 1977.

Tian H, Gao Z, Li H, Zhang B, Wang G, Zhang Q, Pei D, Zheng J. DNA damage response – a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer Lett* 358(1):8-16. 2015.

Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276(51):47759-62. 2001.

Waters CA, Strande NT, Wyatt DW, Pryor JM, Ramsden DA. Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair (Amst)* 17:39-51. 2014.

Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD, Köberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110(3):352-61. 2004.

White RJ, Durr FE. Development of mitoxantrone. *Invest New Drugs* 3(2):85-93. 1985.

Willmore E, Errington F, Tilby MJ, Austin CA. Formation and longevity of idarubicin-induced topoisomerase II cleavable complexes in K562 human leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* 63(10):1807-15. 2002.

Willmore E, Frank AJ, Padget K, Tilby MJ, Austin CA. Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol* 54(1):78-85. 1998.

Wood RD. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. *Environ Mol Mutagen* 51(6):520-6. 2010.

Zecevic A, Sampath D, Ewald B, Chen R, Wierda W, Plunkett W. Killing of chronic lymphocytic leukemia by the combination of fludarabine and oxaliplatin is dependent on the activity of XPF endonuclease. *Clin Cancer Res* 17(14):4731-41. 2011.

Zeng Z, Cortés-Ledesma F, El Khamisy SF, Caldecott KW. TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *J Biol Chem* 286(1):403-9. 2011.

Zeng Z, Sharma A, Ju L, Murai J, Umans L, Vermeire L, Pommier Y, Takeda S, Huvlebroeck D, Caldecott KW, El-Khamisy SF. TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic Acids Res* 40(17):8371-80. 2012.

Zhang J, Walter JC. Mechanisms and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)* 19:135-42. 2014.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lyu YL, Yeh ET. Identification of molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 18(11):1639-42. 2012.

Zhao H, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation. *Cell Cycle* 7(19):3048-55. 2008.

Zheng H, Wang X, Warren AJ, Legerski RJ, Nairn RS, Hamilton JW, Li L. Nucleotide excision repair – and polymerase η -mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* 23(2):754-61. 2003.

ANEXO I

Carta do editor da revista *DNA Repair*, confirmando o aceite para publicação do artigo “Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity”.

De: "Bennett Van Houten (DNA Repair)" <EviseSupport@elsevier.com>

Data: 5 de abril de 2016 02:19:15 BRT

Para: jenifers@ufcspa.edu.br

Assunto: Amended decision on DNAREP_2015_27

Responder A: vanhoutenb@upmc.edu

Ref: DNAREP_2015_27

Title: Influence of Nucleotide Excision Repair on Mitoxantrone Cytotoxicity

Journal: DNA Repair

Dear Dr. Saffi,

I am pleased to inform you that I have amended my decision on the manuscript referenced above. After careful review of your manuscript, I have accepted it for publication. Your manuscript will proceed to copy-editing and production soon.

Thank you for giving us the opportunity to consider your work.

Kind regards,

Bennett Van Houten
Handling Editor
DNA Repair

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO II

Carta do editor da revista *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*, confirmando o aceite para publicação do artigo “Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA damage induced by Topoisomerase II Inhibitors”.

Assunto: Your Submission

Data: 8 Apr 2016 15:27:59 +0100

De: Mutation Research Reviews <mutrev@elsevier.com>

Para: jenifers@ufcspa.edu.br, jenifer.saffi@gmail.com

Ms. Ref. No.: MUTREV-D-15-00047R2

Title: Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA damage induced by Topoisomerase II Inhibitors

Mutation Research - Reviews

Dear Dr. Jenifer Saffi,

I am pleased to inform you that your paper "Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA damage induced by Topoisomerase II Inhibitors" has been accepted for publication in Mutation Research - Reviews.

You will soon receive a communication from Elsevier providing details regarding copyright, reprints, and your galley proof.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Elsevier will provide a free online subscription to the journal to the corresponding author and will make free all color plates both in hard copy and online.

Thank you for submitting your work to Mutation Research - Reviews.

Yours sincerely,

Michael D. Waters, Ph.D.
Editor
Mutation Research - Reviews

ANEXO III

Curriculum Vitae

Rocha, JC

Dados pessoais

Nome: Jaqueline Cesar Rocha

Endereço profissional: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Av. Sarmiento Leite, 245 Anexo III Laboratório 714
Centro - Porto Alegre
90050-170, RS - Brasil

Telefone: 51 33038861

Endereço eletrônico: jrocha01@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2016 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Influência do reparo por excisão de nucleotídeos na citotoxicidade mitoxantrona

Orientador: Jenifer Saffi

2007 - 2009 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Interações genéticas entre o gene KIN3 e os genes do Complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador: Jenifer Saffi

1996 - 2000 Graduação em FARMÁCIA.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Avaliação da atividade antioxidante ou pró-oxidante do palmitato de retinol sobre células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador: Ana Lígia Lia de Paula Ramos

Co-orientador: Jenifer Saffi

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

2011 - Atual	Vínculo: Outro. Enquadramento funcional: Doutorando
2007 - 2009	Vínculo: Outro. Enquadramento funcional: Mestrando
2005 - 2007	Vínculo: Outro. Enquadramento funcional: Estagiário
1999 - 2000	Vínculo: Iniciação científica. Enquadramento funcional: Bolsista

2. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

2011 - Atual	Vínculo: Outro. Enquadramento funcional: Aluno de doutorado - visitante
--------------	---

3. Hospital São Lucas da PUCRS

2003 - 2011	Vínculo: Funcionário. Enquadramento funcional: Farmacêutica
-------------	---

Atividades

10/2003 - 10/2005	Representante do Serviço de Farmácia na Comissão de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde do HSL
10/2003 - 10/2008	Manipulação de medicamentos injetáveis, quimioterápicos e nutrição parenteral
10/2003 - 04/2011	Co-administração da Farmácia Hospitalar
10/2003 - 04/2011	Assistência farmacêutica
10/2003 - 04/2011	Orientação de estagiários curriculares e extra-curriculares do curso de Farmácia; Treinamento continuado de funcionários (auxiliares de farmácia)

4. Dimed S A Distribuidora de Medicamentos - DIMED

2001 - 2003	Vínculo: Funcionário, Enquadramento funcional: Farmacêutico
-------------	---

Atividades

01/2001 - 10/2003	Farmacêutica responsável técnica
-------------------	----------------------------------

5. Hospital Nossa Senhora da Conceição - GHC

2014 - 2015	Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Farmacêutica
-------------	--

Atividades

08/2014 - 10/2014	Orientação de estagiário curricular de curso de Farmácia
03/2014 - 02/2015	Co-administração da farmácia hospitalar

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual Influência do reparo por excisão de nucleotídeos na resistência a mitoxantrona em linhagens celulares de leucemia
- Integrantes: Franciele Faccio Busatto, Jaqueline Cesar Rocha; Victória Pereira Viero, Jenifer Saffi
- 2013 - Atual CNPQ - 2013 - Influência dos mecanismos de resposta a danos ao DNA na toxicidade de inibidores da enzima topoisomerase II
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; João Antonio Pegas Henriques; Jenifer Saffi; Guido Lenz; Franciele Faccio Busatto; Temenouga Nikolova Guecheva; Larissa Milano de Souza; Roberto Marques Damiani
- 2012 - Atual FAPERGS- Pesquisador gaúcho 2012 - Avaliação do mecanismo de citotoxicidade, resistência e cardiotoxicidade de derivados de antraciclina.
- Descrição: Este projeto tem por objetivos principais avaliar a contribuição dos mecanismos de reparo do DNA na citotoxicidade da mitoxantrona em células proficientes ou deficientes em mecanismos de reparo de DNA, bem como a influência destes mecanismos de reparo na resistência à quimioterapia por doxorubicina em linhagem celular de câncer de mama. Além disso, verificar os mecanismos de reparo do DNA na toxicidade da doxorubicina e de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos e a sua relação com a proteína PARP.
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; João Antonio Pegas Henriques; Jenifer Saffi; Dinara Jaqueline Moura; Franciele Faccio Busatto; Temenouga Nikolova Guecheva; Carlos Frederico Martins Menck; Larissa Milano de Souza; Roberto Marques Damiani
- 2011 - Atual Efeitos dos inibidores da topoisomerase II sobre células deficientes no reparo de DNA
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; Jenifer Saffi (Responsável); Franciele Faccio Busatto; Lisiane Knob de Souza, Victoria Pereira Viero
- 2011 - Atual Efeitos do antineoplásico mitoxantrona sobre células deficientes no reparo de DNA
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; Jenifer Saffi; Franciele Faccio Busatto; Lisiane Knob de Souza; Victória Pereira Viero
- 2006 - 2009 Estudo das interações genéticas do gene KIN3 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e os genes do complexo MRX.

Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; João Antonio Pegas Henriques; Jenifer Saffi; Ana Catarina Romano; Guido Lenz; Bruna Frielink Immich; Bruna Castilhos; Dinara Jaqueline Moura

- 2005 – 2007 Avaliação da atividade do composto ebselen sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; Jenifer Saffi; Simone T. Miorelli; Larissa A. C. Lobo
- 1999 – 2000 Avaliação da atividade antioxidante e/ou pró-oxidante do palmitato de retinol sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; Ana Ligia Lia de Paula Ramos; Jenifer Saffi
- 1999 - 2001 Clonagem e caracterização molecular do gene PSO3 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Integrantes: Jaqueline Cesar Rocha; João Antonio Pegas Henriques; Jenifer Saffi; Cláudia Aiub

Produção técnica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MIORELLI, S. T., ROSA, R. M., MOURA, D. J., ROCHA, J. C., LOBO, L. A. C., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J.

Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis.* , v.23, p.93 - 99, 2008

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BUSATTO, F. F., VIERO, V. P., ROCHA, J. C., SAFFI, J.

Influence of DNA damage response mechanisms in leukemic cells resistant to the antineoplastic drug mitoxantrone In: 23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu, Brasil.

2. BUSATTO, F. F., **ROCHA, J. C.**, SAFFI, J.

Influence of nucleotide excision repair machinery on mitoxantrone cytotoxicity In: 11th International Conference on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu.

3. **ROCHA, J. C.**, BUSATTO, F. F., SAFFI, J.

Mitoxantrone induces lesions that are recognized by transcription-coupled nucleotide excision repair pathway In: 11th International Conference on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu.

4. BUSATTO, F. F., **ROCHA, J. C.**, SAFFI, J.

Influence of Nucleotide Excision Repair on Mitoxantrone Cytotoxicity In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.

5. IMMICH, B. F., MOURA, D. J., **ROCHA, J. C.**, HENRIQUES, J. A. P., LENZ, G., SAFFI, J.

Interação da proteína Kin3 de *Saccharomyces cerevisiae* com proteínas do complexo MRX utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura In: XXI Salão de Iniciação Científica - XVII Feira de Iniciação Científica - IV Salão UFRGS Jovem, 2009, Porto Alegre - RS.

6. **ROCHA, J. C.**, MOURA, D. J., IMMICH, B. F., HENRIQUES, J. A. P., LENZ, G., SAFFI, J.

NIMA-related kinase kin3p interacts with the MRX complex in *Saccharomyces cerevisiae* In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto - MG.

7. IMMICH, B. F., **ROCHA, J. C.**, MOURA, D. J., CASTILHOS, B., SPEROTTO, A. R. M., HENRIQUES, J. A. P., LENZ, G., SAFFI, J.

Avaliação da interação do gene KIN3 com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae* In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre.

8. IMMICH, B. F., ROCHA, J. C., MOURA, D. J., CASTILHOS, B., SPEROTTO, A. R. M., HENRIQUES, J. A. P., LENZ, G., SAFFI, J.

Avaliação da interação do gene KIN3 com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae* In: XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.

9. BALEN, M. A., GOERCK, G. C., **ROCHA, J. C.**, MARQUES, B. C., SOUZA, J. C.

Avaliação dos estornos de medicamentos em um hospital de ensino de Porto Alegre In: II Congresso Brasileiro sobre Uso Racional de Medicamentos, 2007, Florianópolis.

10. ROMANO, A. C., MOURA, D. J., **ROCHA, J. C.**, HENRIQUES, J. A. P., LENZ, G., SAFFI, J.

Interação genética ente o gene KIN3 e os genes do complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae* In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.

11. LOBO, L. A. C., **ROCHA, J. C.**, SAFFI, J., MIORELLI, S. T.

Avaliação do ebselen sobre o estado redox celular e sobre a integridade genômica em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* In: XII Salão de Iniciação Científica e Tecnológica da Ulbra, 2006, Canoas - RS.

XII Salão de Iniciação Científica e Tecnológica da Ulbra. , 2006.

12. MIORELLI, S. T., LOBO, L. A. C., **ROCHA, J. C.**, SAFFI, J.

Efeitos biológicos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas In: I Encontro sobre Selênio e Telúrio, 2006, Bento Gonçalves - RS.

13. LOBO, L. A. C., MIORELLI, S. T., **ROCHA, J. C.**, SAFFI, J.

Efeitos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre - RS.

14. ROSA, R. M., **ROCHA, J. C.**, HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J.

Análise de interações genéticas entre a mutação *ps0-3* e mutantes defectivos na reparação por excisão de bases na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis - GO.

15. ROSA, R. M., **ROCHA, J. C.**, HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J.

Genetic interactions between *ps03-1* and base excision repair mutants of *Saccharomyces cerevisiae* In: XXXI Reunião Anual da SBBq, 2002, Caxambú.

16. ROHERS, R., **ROCHA, J. C.**, RAMOS, A. L. P., SAFFI, J.

Glutathione measurement of *sod* deficiente *S. cerevisiae* strains using a microbiological quantitative assay In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis - GO.

17. LEISTER, L. A., **ROCHA, J. C.**, MENGER, V. M., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J.

Atividade do palmitato de retinol em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* In: XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2000, Porto Alegre - RS.

18. **ROCHA, J. C.**, AIUB, C., SAFFI, J., HENRIQUES, J. A. P.

Clonagem e caracterização molecular do gene *PSO3* de *Saccharomyces cerevisiae* In: XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2000, Porto Alegre - RS.

Participação em eventos

1. IX Congresso Brasileiro de Biosegurança, 2015. Porto Alegre – RS

2. Toxi-Latin 2014, 2014. Porto Alegre – RS
3. 11th International Conference on Environmental Mutagens, 2013. Foz do Iguaçu – PR
4. 10th International Congress on Cell Biology, 2012. Rio de Janeiro – RJ
5. XVII Alexander Hollaender Course, 2012. Montevideo – UR
6. III Jornada de Farmácia Hospitalar do HSL PUCRS, 2005. Porto Alegre – RS
7. I Congresso Brasileiro sobre Uso Racional de Medicamentos, 2005. Porto Alegre – RS
8. II Jornada de Farmácia Hospitalar do HSL-PUCRS, 2004. Porto Alegre – RS

Organização de evento

1. III Jornada de Farmácia Hospitalar do HSL-PUCRS, 2005. Porto Alegre – RS
2. II Jornada de Farmácia Hospital do HSL-PUCRS, 2004. Porto Alegre – RS

Demais produção técnica

ROCHA, J. C. Manual de Administração de Medicamentos Injetáveis Pediátrico, Hospital São Lucas da PUCRS, 2010. Desenvolvimento de material didático ou instrucional

ROCHA, J. C. Manual de Administração de Medicamentos através de Sondas de Nutrição Enteral, Hospital São Lucas da PUCRS, 2008. Desenvolvimento de material didático ou instrucional

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. ROCHA, J. C. Medicamentos e automedicação. Programa Viver com Saúde, PUCRS, 2007

Orientações e Supervisões

Trabalho de conclusão de curso de graduação (Co-orientadora):

1. Lisiane Knob de Souza. Influência do reparo por excisão de nucleotídeos na citotoxicidade do antineoplásico mitoxantrona. 2015. Curso (Biomedicina) - Centro Universitário Ritter dos Reis
2. Franciele Faccio Busatto. Influência do reparo por excisão de nucleotídeos na toxicidade do antineoplásico mitoxantrona. 2012. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Iniciação científica:

1. Débora Dalmas Gräf. Efeitos do antineoplásico mitoxantrona sobre células deficientes no reparo de DNA. 2013. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

2. Lisiane Knob de Souza. Efeitos dos inibidores da topoisomerase II sobre células deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos. 2013 - 2015. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
3. Franciele Faccio Busatto. Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona. 2011-2012. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
4. Bruna Frielink Immich. Interações genéticas do gene KIN3 com genes do complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*. 2008-2009. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
5. Ana Catarina Romano e Silva. Interações genéticas do gene KIN3 com genes do complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*. 2007-2008. Iniciação científica (FARMÁCIA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Participação em banca de trabalhos de conclusão

1. ROCHA, J. C. Participação em banca de Enzo Zardo da Silva. Avaliação da região reguladora do gene KIN3 frente ao estresse genotóxico induzido em linhagens mutantes para as proteínas do complexo MRX de *Saccharomyces cerevisiae*, 2011. (Biomedicina) Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. ROCHA, J. C. Participação em banca de Sibéli Maria da Rosa. Avaliação in vivo da atividade anti-inflamatória de duas formulações de *Plantago major* L., 2011. (Farmácia) Universidade de Santa Cruz do Sul
3. ROCHA, J. C. Participação em banca de Fernanda Rambo Schmitz. Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade de um veneno de sapo em células tumorais de mamíferos, 2011. (Farmácia) Universidade de Santa Cruz do Sul