



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA



Avaliação dos mecanismos de ação dos novos agentes
Zalypsis, Tryptamicidin e 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto

TESE DE DOUTORADO

Miriana da Silva Machado

Porto Alegre, 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA



Avaliação dos mecanismos de ação dos novos agentes
Zalypsis, Tryptamicidin e 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto

Miriana da Silva Machado

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica desta Universidade como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, 2011.

*Dedico este trabalho à
minha mãe **Marli** que
sempre foi exemplo de
força, trabalho e
perseverança.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques pelos ensinamentos, oportunidades e amizades nesses últimos nove anos de convivência. Obrigada Henriques por tudo!

A CAPES, CNPq, FAPERGS e Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica - ROYAL pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. José Cláudio Moreira, Dr. Guido Lenz, Dr. Carlos F. Menck, Dr. Fábio Klampert e Dr. Márcia Wink por terem aceitado o convite de participação na banca desta tese. Agradeço também pelos comentários e discussões propiciadas pelos membros da banca durante a defesa desta tese.

A Prof^a. Dr. Annette K. Larsen pela orientação durante o estágio sanduíche em Paris. Agradeço também pelas colaborações realizadas com outros laboratórios de pesquisa e pela possibilidade de retornar à França por alguns meses suplementares para a conclusão desta tese.

Ao Dr. Alexandre Escargüeil e Dr. Danièle G. Soares pelas ótimas discussões e ensinamentos sobre biologia celular. Também agradeço pela amizade, companheirismo e todas as ajudas com as burocracias que foram fundamentais para a minha adaptação. E claro Danièle...muito obrigada pelas manipulações e pela apresentação de Paris!

Aos professores Dr. Alain Sarasin (*Génome et Cancer* no *Institut Gustave Roussy*, Villejuif, França), Dr. Marcel Michéli e Dr. Malik Lutzmann (*Réplication et Dynamique du Génome* no *Institut de Génétique Humaine*, Montpellier, França) pelas colaborações realizadas.

A todos os colegas e amigos do laboratório GENOTOX-ROYAL Miriam, Izabel, Jaqueline, Bethânia, Roseli, Márcia, Gabriel, Mônica, Tamiris, Nucha, Grazia, Flávia e Paula pelo apoio e paciência nos momentos que eu estava me dedicando à realização dos experimentos e elaboração da tese.

Aos amigos do laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica desta Universidade: Dinara, Diana, Arigony, Larissa, Cristiano, Renata, Fabrício, Albanin, Valéria, Brunas, Claire, Cláudio, Michele, Nucha, Jaque Rocha, Ângelo, Lyda, Grethel e demais simpatizantes pelos auxílios e parcerias durante este trabalho e principalmente nas comemorações!!

Aos amigos do laboratório *Biologie et Thérapeutiques du Cancer* e no *Centre de Recherche Saint-Antoine* INSERM – UPMC (Paris, França) Djamila, Karima, Amelie, Aude-Marie, Nyam, Cláudia, Céline, Radia e demais colegas pelos divertidos sábados, domingos e feriados no laboratório, auxílios e convivência.

Ao grupo das quatro: Miriam, Bel e Camaila pela amizade, paciência e auxílios até às 23 h no campus do Vale...

A Cecilia, Miriam, Dini Azeredo e Dini Severo pela amizade e que, mesmo não sendo da área, dedicaram o seu tempo à revisão desta tese.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma me apoiaram na realização deste trabalho e que foram compreensíveis nas minhas ausências.

Em especial, agradeço a minha irmã Milena, dindas Silvana e Antônia e dindo Neri pelos incentivos e por todo o apoio nas logísticas familiares que foram fundamentais para a realização deste doutorado.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta tese foi desenvolvida principalmente nos laboratórios GENOTOX-ROYAL – Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Reparação de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica desta Universidade, *Biologie et Thérapeutiques du Cancer* e no *Centre de Recherche Saint-Antoine* INSERM – UPMC (Paris, França). Algumas metodologias foram realizadas nos laboratórios *Génome et Cancer* no *Institut Gustave Roussy* - CNRS UMR8200 (Villejuif, França), sob a supervisão do Dr. Alain Sarasin e no laboratório *Réplication et Dynamique du Génome* no *Institut de Génétique Humaine* - CNRS UPR1142 (Montpellier, França), sob a supervisão do Dr. Malik Lutzmann e do Dr. Marcel Méchali. Este trabalho foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Projeto CAPES/COFECUB n° 583/07), pelo Projeto PRONEX/FAPERGS/CNPq n° 10/0044-3, pelo *Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale* (INSERM, França) e pelo Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL.

ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho está dividido na seguinte forma: Introdução Geral, Objetivos (gerais e específicos), três capítulos escritos na forma de artigos científicos contendo uma página de apresentação sobre o assunto, Discussão Geral, Conclusões (gerais e específicas), Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexo.

A Introdução Geral contempla um breve comentário sobre as estatísticas atuais do câncer, uma síntese dos tipos de tratamentos utilizadas no tratamento do câncer e algumas novas terapias antitumorais que estão em desenvolvimento. Dando sequência, a introdução aborda os estudos sobre as ecteinascidinas trabectedina, Zalypsis e Tryptamicidin bem como sobre os compostos de selênio, principalmente o 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto.

O Capítulo I descreve um estudo realizado com o Zalypsis utilizando diferentes linhagens celulares normais ou tumorais. Neste Capítulo, buscou-se identificar as principais vias celulares ativadas em resposta ao tratamento com o Zalypsis, enfatizando os sistemas de reparação e de sinalização de danos no DNA. Estes resultados deram origem a um manuscrito que será submetido à revista *Clinical Cancer Research*.

No Capítulo II, estão ilustrados os resultados obtidos com o estudo do Tryptamicidin em linhagens tumorais sensíveis ou resistentes à cisplatina. Utilizando diferentes linhagens, o envolvimento do sistema de reparação de nucleotídeos na citotoxicidade do Tryptamicidin bem como os efeitos da associação deste medicamento antitumoral com a cisplatina foram

investigados. Este Capítulo foi recentemente aceito para publicação no periódico *Molecular Cancer Therapeutics*.

O Capítulo III apresenta o estudo realizado com o composto orgânico de selênio 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD) em diferentes modelos biológicos. Os experimentos realizados neste trabalho mostraram que o DFDD protege o DNA contra os efeitos genotóxicos e mutagênicos do agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e que estes efeitos se devem à capacidade do DFDD em degradar diretamente a molécula do H₂O₂. Estas observações foram publicadas na revista *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

No Capítulo IV estão descritos resultados adicionais obtidos sobre a citotoxicidade dos agentes Zalypsis, Tryptamicidin e trabectedina em diferentes linhagens tumorais e também em linhagens deficientes em vias de reparação de DNA. Além disso, este Capítulo engloba os estudos sobre o envolvimento da maquinaria de replicação e *checkpoint* em extratos de *Xenopus laevis*.

As Discussões Gerais contemplam os comentários sobre os resultados apresentados nos quatro Capítulos e a sua importância para a contribuição científica deste estudo. Após, estão descritas as Conclusões e as Perspectivas geradas por este trabalho, as Referências Bibliográficas utilizadas na elaboração desta tese e o anexo.

RESUMO

Os novos agentes alquilantes Zalypsis e o Tryptamicidin são moléculas estruturalmente relacionadas à trabectedina e possuem a habilidade de ligarem-se à volta menor do DNA. Por apresentarem potente atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*, estes agentes estão atualmente sendo avaliados em ensaios clínicos I e II para o tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos e hematológicos. Por outro lado, o 3'3-ditrifluometildifenil dissenleto (DFDD) é um composto orgânico de selênio que demonstra interessantes atividades antioxidantes em modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* e está em fase inicial de desenvolvimento. No presente trabalho, buscou-se avaliar os mecanismos de ação dos três novos agentes principalmente em relação à maquinaria macromolecular. Dentre os principais resultados encontrados, destaca-se a potente atividade citotóxica do Zalypsis e Tryptamicidin em diferentes linhagens tumorais e a capacidade de indução de quebras duplas no DNA (DSB) de maneira dependente de replicação por esses agentes. Além disso, a utilização de linhagens celulares deficientes em genes que codificam proteínas envolvidas nos sistemas de reparação por recombinação homóloga (HRR) e não-homóloga (NHEJ), permitiu a identificação do sistema HRR como a principal via implicada na reparação das lesões induzidas pelo Zalypsis e Tryptamicidin. Por outro lado, embora o NER não seja capaz de reparar as lesões induzidas pelo Tryptamicidin, este agente mostrou interferir na maquinaria do NER, impedindo a reparação de lesões induzidas pelo UV, como verificado pelo teste UDS. Considerando que linhagens tumorais resistentes a agentes platinados possuem uma alta atividade das enzimas do NER, buscou-se investigar a ação do Tryptamicidin nestas células. Como esperado, o Tryptamicidin, assim como a trabectedina, demonstrou potente atividade citotóxica nestas linhagens e ainda mostrou efeito sinérgico quando associado à cisplatina em linhagens resistentes a este agente platinado. Adicionalmente, usando linhagens celulares tumorais e extratos de ovos de *Xenopus laevis*, foi verificado que o Zalypsis, mesmo em baixas concentrações e curtos períodos de tratamento, também é capaz de bloquear a replicação sem causar, no entanto, parada no ciclo celular e ativação das vias clássicas de sinalização de danos no DNA (*DNA damage response*). Adicionalmente, foi observado pela primeira vez que o DFDD foi capaz de proteger o DNA contra os efeitos genotóxicos e mutagênicos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em diferentes modelos biológicos. Estes resultados reforçam as atividades antioxidantes deste composto de selênio que parecem estar relacionadas à ação direta do DFDD na molécula do H_2O_2 . Os dados apresentados nesta tese elucidaram aspectos importantes dos mecanismos de ação dos novos agentes Zalypsis, Tryptamicidin e DFDD, ressaltando a importância dessas moléculas que, como agentes únicos ou em associação, poderão contribuir para a melhoria da terapia antitumoral.

ABSTRACT

Zalypsis and Tryptamicidin are new covalent minor groove binders structurally related to trabectedin. Both compounds have shown potent antitumoral activities *in vitro* and *in vivo* tumor models and are currently under clinical phase I and II in patients with different haematological and solid tumors. 3,3'-dithiobis(4-methylphenyl) diselenide (DFDD) is an organic selenium compound that demonstrated interesting antioxidant activities both *in vitro* and *in vivo* and is under early phase of development. The aim of this work was evaluate the mechanism of action of these new products focusing on the macromolecular machinery. Interestingly, Zalypsis and Tryptamicidin display strong cytotoxic activities in different tumor cell lines and these drugs are able to induce replication-dependent double strand breaks (DSB). Using homologous recombination repair (HRR) and nonhomologous end-joining repair (NHEJ) deficient and proficient cell lines, it was found that the HRR is the principal pathway implicated in the repair of the DNA lesions induced by Zalypsis and Tryptamicidin. Our results also demonstrate that although Tryptamicidin is not repaired by NER, this compound is able to interfere with the NER machinery thereby attenuating the repair of specific NER substrates, as verified by UDS test. Importantly, Tryptamicidin and trabectedin show unchanged or even enhanced activity towards all four cisplatin- and oxaliplatin-resistant cell lines and combinations of these drugs and cisplatin were mostly synergistic toward both parental and cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. We also demonstrate for the first time that Zalypsis, even in low doses and short treatment periods, was able to block the replication in tumor cell lines and *Xenopus laevis* egg extracts. Interestingly, this blockage did not trigger cell cycle arrest or DNA damage response and, as a result, leads to early cell death. On the other hand, DFDD is able to protect the DNA against the genotoxicity and mutagenicity induced by hydrogen peroxide in bacteria, yeast and cultured mammalian cells. Using *in vitro* tests, we also illustrated that DFDD directly acts on H₂O₂ molecule mimicking catalase-like activity. Indeed, these results reinforce the antioxidant property of DFDD that probably play a fundamental role in the DNA protection showed by this selenium compound. Taken together, our findings elucidate important aspects of the mechanism of action of the new agents Zalypsis, Tryptamicidin and DFDD, highlighting the promising activities of these drugs which, employed as single or in association, might contribute for the antitumoral therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU: 5-Fluorouracila.

α (P³²)dCTP: citosina marcada com fósforo 32.

γ H2AX: histona H2AX fosforilada na serina 139.

ATM: cinase ataxia telangiectasia mutada (*ataxia telangiectasia mutated kinase*).

ATR: cinase ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada (*ATM and RAD3-related kinase*).

BER: reparação por excisão de bases (*base excision repair*).

BRCA: gene do câncer de mama (*breast cancer gene*).

BSA: albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*).

CDK: cinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*).

CHK1: cinase checkpoint 1 (*checkpoint kinase 1*).

CHK2: cinase checkpoint 2 (*checkpoint kinase 2*).

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DDR: resposta a danos ao DNA (*DNA damage response*).

DFDD: 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto.

dsDNA: DNA fita dupla (*double strand DNA*).

DNA: ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*).

DNA-Pk: proteína cinase dependente de DNA (*DNA-dependent protein kinase*).

DOX: doxorrubicina.

DPDS: difenil disseleneto.

DSB: quebras de fita dupla de DNA (*double strand breaks*).

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor*).

ETs: ecteinascidinas.

FA: Anemia de Fanconi (*Fanconi Anemia*).

FDA: *Food and Drug Administration*.

FdUMP: monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GPx: glutathiona peroxidase.

GSH: glutathiona.

GST: glutathiona-S-transferase.

H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

HRR: reparação por recombinação homóloga (*homologous recombination repair*).

INCA: Instituto Nacional de Câncer.

MGBs: agentes que se ligam à volta menor do DNA (*DNA minor groove binders*).

MGMT: O-6-metilguanina metiltransferase.

MMR: reparação de bases mal-emparelhadas (*mismatch repair*).

MSA: ácido metilsselenínico.

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*.

NER: reparação por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*).

NHEJ: reparação por recombinação não-homóloga (*non-homologous end-joining repair*).

O₂⁻: radical superóxido.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PARP: poli (adenosina difosfato ADP-ribose) polimerase.

PBS: tampão fosfato salina.

PM00104: Zalypsis®.

PM01183: Tryptamicidin®.

PTZ: pentilenotetrazol.

Se: selênio.

SOD: superóxido dismutase.

SSB: quebras de fita simples de DNA (*single strand breaks*).

ssDNA: DNA fita simples (*single stranded DNA*)

TOP: topoisomerases.

TR: tiorredoxina redutase.

TLS: reparação por síntese translesão (*translesion synthesis repair*)

UDS: síntese de DNA não programada (*unscheduled DNA synthesis*).

UV: ultravioleta.

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Terapias antitumorais	19
1.1.1 Inibidores mitóticos	21
1.1.2 Agentes genotóxicos	21
1.1.2.1 Agentes alquilantes	24
1.1.2.2 Inibidores de topoisomerasas	25
1.1.2.3 Antimetabólitos	25
1.1.2.4 Antibióticos	27
1.1.3 Terapias-alvo	27
1.2 Ecteinascidinas	32
1.2.1 Zalypsis	37
1.2.2 Tryptamicidin	40
1.3 Compostos de selênio	43
1.3.1 O composto 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto	48
2. OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
 CAPÍTULO I - The DNA minor groove binder Zalypsis induces early apoptosis without trigger DNA damage response in tumor cells	 53
 CAPÍTULO II - Trabectedin and its C-subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells	 86
 CAPÍTULO III - 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: a new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities	 102
 CAPÍTULO IV – Resultados adicionais	 113
4. Resultados adicionais.....	114
4.1 Materiais e métodos.....	116
4.1.1 Reagentes e células.....	116
4.1.2 Ensaio de citotoxicidade.....	117
4.1.3 Ensaio Cometa.....	118
4.1.4 Ensaio de imunocitoquímica.....	119
4.1.5 Cinética de replicação em <i>Xenopus laevis</i>	120
4.1.6 Imunocitoquímica em extratos de <i>Xenopus laevis</i>	120
4.1.7 Western blot.....	121

4.2 Resultados.....	122
4.2.1 Ensaio de Redução de MTT.....	122
4.2.2 Ensaio Cometa.....	125
4.2.3 Cinética de replicação em extratos de <i>Xenopus laevis</i>	127
4.2.4 Imunocitoquímica na linhagem HeLa-M.....	129
4.2.5 Western blot em extratos de <i>Xenopus laevis</i>	131
3. DISCUSSÃO GERAL	132
4. CONCLUSÕES	149
4.1 Conclusão geral	149
4.2 Conclusões específicas	150
5. PERSPECTIVAS	152
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXO - <i>Curriculum vitae</i>	164

1. INTRODUÇÃO GERAL

O termo *câncer*, o qual provém da palavra grega *carcinós*, é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças localizadas em diferentes regiões do organismo. Desde a Grécia antiga há relatos da existência do câncer, bem como os tratamentos utilizados que consistiam em preparações tóxicas e remoção por cirurgia, como a mastectomia descrita durante o período romano (Papac, 2001).

O câncer, também chamado de tumor ou neoplasia, é uma doença caracterizada pela proliferação rápida e descontrolada de células anormais que induzem uma série de interações celulares no próprio ambiente, podendo invadir tecidos vizinhos e até mesmo órgãos distantes (Zou, 2005, WHO, 2011). O tumor surge de uma única célula e a progressão de uma célula normal à célula tumoral é um processo com múltiplos estágios. Estas alterações resultam de interações entre fatores genéticos e agentes externos, como por exemplo, carcinógenos físicos (radiações ionizantes e ultra-violeta), químicos (componentes do cigarro) e biológicos (vírus, bactérias e parasitas) (Parkin, 2001, WHO, 2011). Além da exposição a agentes nocivos e hábitos de vida, o envelhecimento é outro fator fundamental no desenvolvimento do câncer (WHO, 2011).

Atualmente, o câncer representa um problema de saúde pública importante tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que no ano de 2008, o câncer liderou a causa de mortalidade no mundo, levando a 7,6 milhões de óbitos, o

que significa 13 % de todas as mortes. Em relação aos tipos de tumor, a maior incidência se deve ao câncer de pulmão, seguido dos tumores de mama, cólon e reto, estômago e próstata (Figura 1, WHO, 2011). Quanto à mortalidade, os tumores de pulmão, estômago, fígado, cólon e reto e mama lideram as causas de morte pelo câncer no mundo (Figura 1, WHO, 2011). Para o ano de 2030, a OMS estima que o câncer seja a causa de mais de 11 milhões de óbitos no mundo (WHO, 2011).

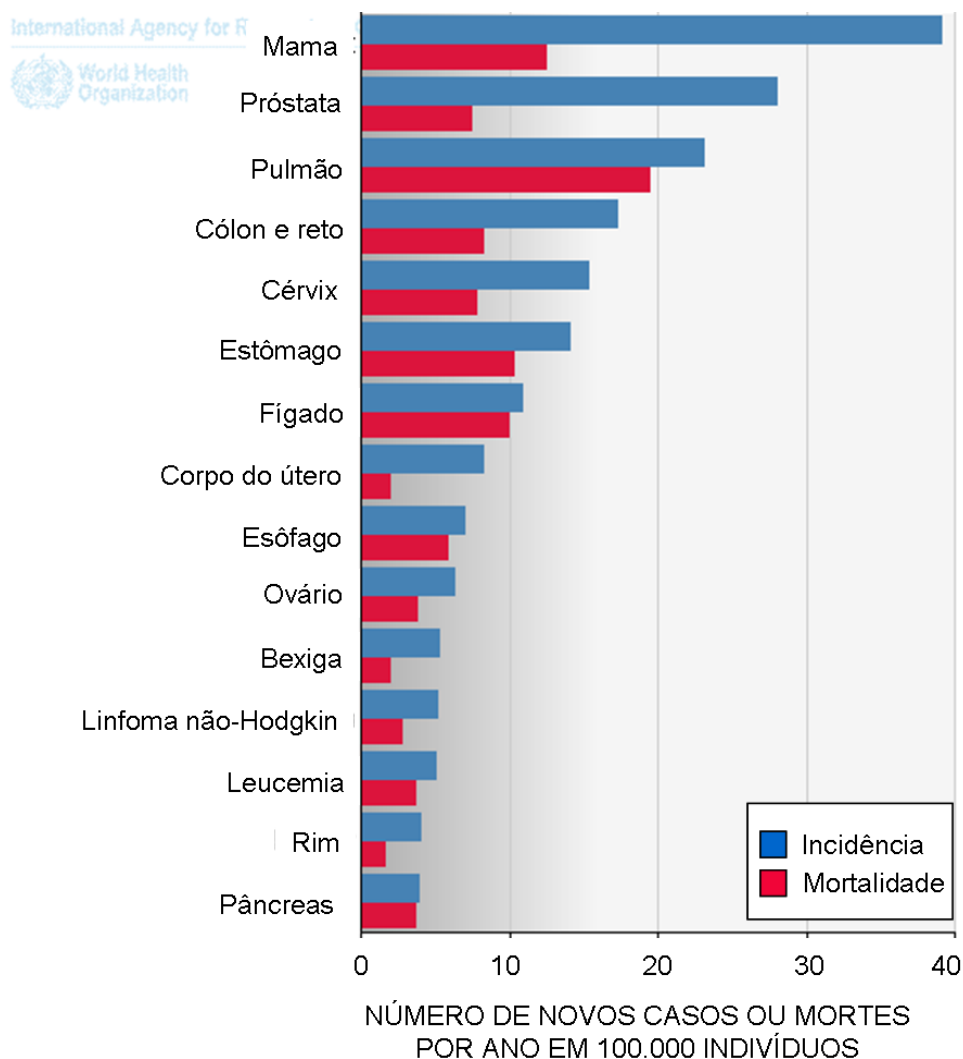


Figura 1. Incidência e mortalidade do câncer no mundo em ambos os sexos e todas as idades no ano de 2008 (adaptado de GLOBOCAN, IARC 2010).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) relata que no ano de 2007, o câncer foi a segunda causa de morte, representando quase 17 % do total de óbitos (INCA, 2009). Segundo as estimativas do INCA, aproximadamente 490 mil casos novos de câncer serão diagnosticados no Brasil em 2011. De maneira semelhante aos outros países da América Latina, sem considerar os tumores de pele do tipo não melanoma, os tumores mais frequentes na população brasileira são os tumores de próstata e pulmão para os homens e de mama e colo do útero para as mulheres (Tabela 1). Dentre as regiões do Brasil, o INCA estima que nos próximos anos, os estados do Centro-Oeste e do Sul apresentarão os maiores índices para todos os tipos de câncer (INCA, 2009).

Tabela 1. Estimativa para o ano de 2011 do número de novos casos de câncer no Brasil, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS (INCA, 2009).

1.1 Terapias antitumorais

O tratamento do câncer consistiu-se basicamente na retirada do tumor por cirurgia até a metade do século XX. Somente a partir de 1960, com a utilização do acelerador linear de partículas, a radioterapia começou a ser utilizada clinicamente para o tratamento de tumores locais. Entretanto, como a cirurgia, a radioterapia não era eficaz contra tumores metastáticos (Chabner & Roberts Jr, 2005). Assim, a busca por tratamentos que atingissem todos os órgãos do corpo, como a quimioterapia, tornou-se o foco dos esforços na cura do câncer.

A quimioterapia baseia-se no emprego de medicamentos antineoplásicos como agentes únicos (monoterapia) ou em associação com outros compostos (multiterapia). Em geral, a combinação de medicamentos demonstra ser mais eficiente do que a utilização de um único composto no tratamento de tumores metastáticos e em pacientes com alto risco de relapso após a intervenção cirúrgica (Graham *et al.*, 1991, Chabner & Roberts Jr, 2005). Além da quimioterapia, existem outros tratamentos utilizados contra o câncer, como a hormônio-terapia (estrógenos, anti-estrógenos, anti-andrógenos) e imuno-terapia (antígenos tumor-específicos, estimulantes do sistema imunológico, anticorpos monoclonais) (ACS, 2010). Diferentemente da quimioterapia tradicional, estas terapias enfocam algumas funções das células neoplásicas, o que aumenta a especificidade de ação no tumor e diminui os efeitos tóxicos ao paciente. No entanto, a hormônio-terapia e a imuno-terapia ainda são empregadas como adjuvantes da quimioterapia (ACS, 2010).

De maneira interessante, Bailly (2009) cita que a “guerra contra o câncer” foi iniciada nos anos 1950, ao mesmo tempo em que começou a

corrida ao espaço. Enquanto Yuri Gagarin esteve pela primeira vez em órbita, alguns medicamentos antitumorais importantes como a doxorubicina e mitomicina C foram descobertos (Bailly, 2009). Nos 50 anos seguidos, várias moléculas foram descobertas, principalmente agentes citotóxicos, dentre os quais um grande número de compostos naturais que ainda são utilizadas na quimioterapia convencional (Figura 2; Bailly, 2009).

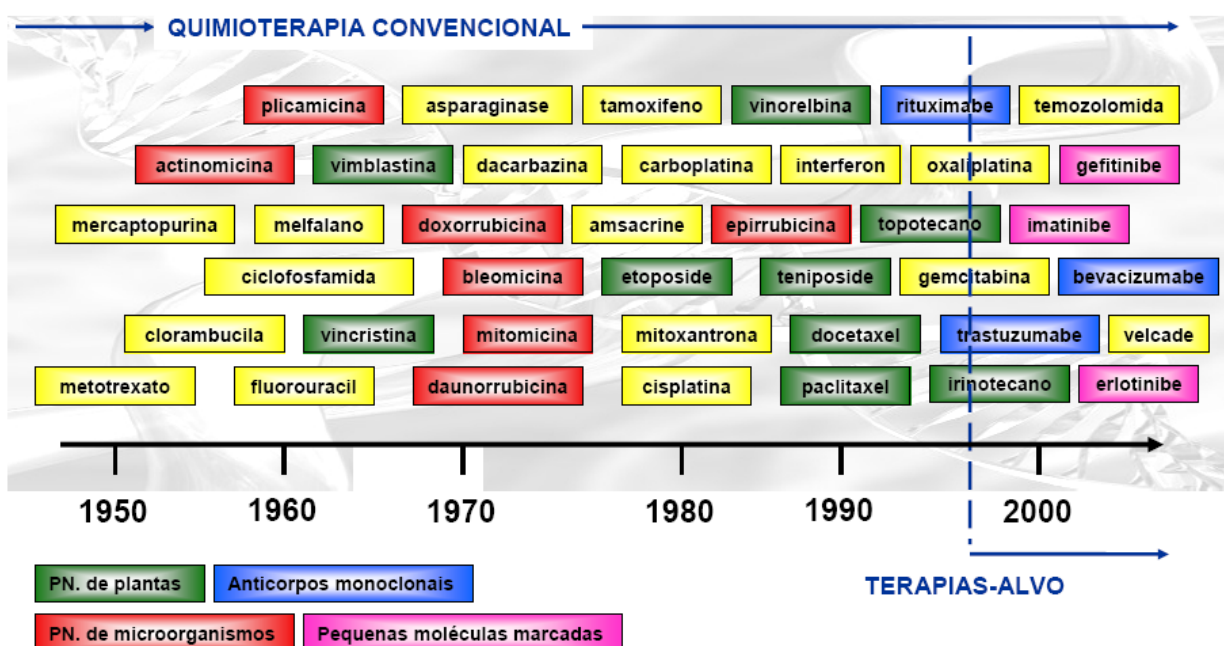


Figura 2. O desenvolvimento dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer no período de 1950 - 2000 (adaptado de Bailly, 2009). PN: produtos naturais.

Atualmente, os medicamentos utilizados no tratamento contra o câncer podem ser classificados em vários grupos e, considerando o mecanismo de ação, os medicamentos quimioterápicos são divididos principalmente em três

grandes classes: inibidores mitóticos, agentes genotóxicos e compostos utilizados como terapia-alvo.

1.1.1 Inibidores Mitóticos

Os inibidores mitóticos são medicamentos que agem durante a mitose, interferindo principalmente nas funções dos microtúbulos, os quais participam da composição do citoesqueleto e estão envolvidos em vários processos celulares, dentre eles a mitose (Nogales, 2001, Perez, 2009). Na mitose, os microtúbulos formam o fuso mitótico, sendo responsáveis pela localização e separação dos cromossomos nos pólos da célula (Perez, 2009). Atualmente, vários agentes antineoplásicos interferem na atividade dos microtúbulos, levando, conseqüentemente, à catástrofe mitótica e morte celular. Como exemplos, os taxanos (paclitaxel, docetaxel) e epotilonas (ixabepilona) estabilizam os microtúbulos, enquanto os alcalóides da vinca (vimblastina, vincristina e vinorelbina) agem desestabilizando os microtúbulos (Perez, 2009). A patupilona e eribulina são alguns exemplos de inibidores mitóticos que estão em fases I e II de testes clínicos para o tratamento do câncer de ovário, respectivamente (Bruning & Mylonas, 2010).

1.1.2 Agentes genotóxicos

A descoberta do DNA como molécula alvo na terapia anti-câncer aconteceu no início do século XX, principalmente durante a I e II Guerra Mundial (Hurley, 2002). Durante a II Guerra, em 1946, descobriu-se que os sintomas linfotóxicos apresentados pelos soldados expostos ao gás mostarda

eram devidos à atividade genotóxica alquilante da mostarda sulfúrica presente no gás (Gilman & Philips, 1943 *apud* Hurley, 2002, Chabner & Roberts Jr, 2005). Como a toxicidade ao sistema linfático está relacionada principalmente à alta capacidade de proliferação destas células, Goodman e colaboradores (1946) analisaram a ação das mostardas nitrogenadas em tumores que possuem uma alta taxa de divisão celular e obtiveram efeitos citotóxicos eficazes contra leucemias e linfomas (Goodman *et al.*, 1946 *apud* Hurley, 2002). Estes resultados, assim como a descoberta da dupla hélice do DNA por Watson e Crick em 1953, encorajaram as pesquisas sobre as interações de pequenas moléculas com os ácidos nucléicos (Lenglet & Cordonnier, 2010). No período entre 1990 e 2006, aproximadamente 18 % das novas moléculas aprovadas pelo FDA para o tratamento do câncer são genotóxicas (Reichert & Wenger, 2008).

Os agentes genotóxicos exercem seus efeitos citotóxicos por interagirem com os ácidos nucléicos, interferindo nas suas funções e levando a vários tipos de lesões. Estes agentes podem causar danos ao DNA de maneira direta, ao se ligarem diretamente na molécula, ou indireta, ao agirem nas enzimas envolvidas na maquinaria nuclear. Além destas atividades, alguns fármacos geram radicais livres, que podem promover oxidações das bases do DNA (Helleday *et al.*, 2008, Larsen & Escargueil, 2009, Granados-Principal *et al.*, 2010). As lesões geradas no DNA, dependendo do tipo e do número, podem levar à parada do ciclo celular e, caso não sejam passíveis de reparo, podem resultar em morte celular. A figura 3 ilustra os tipos de lesões no DNA induzidas por medicamentos antitumorais e radioterapia.

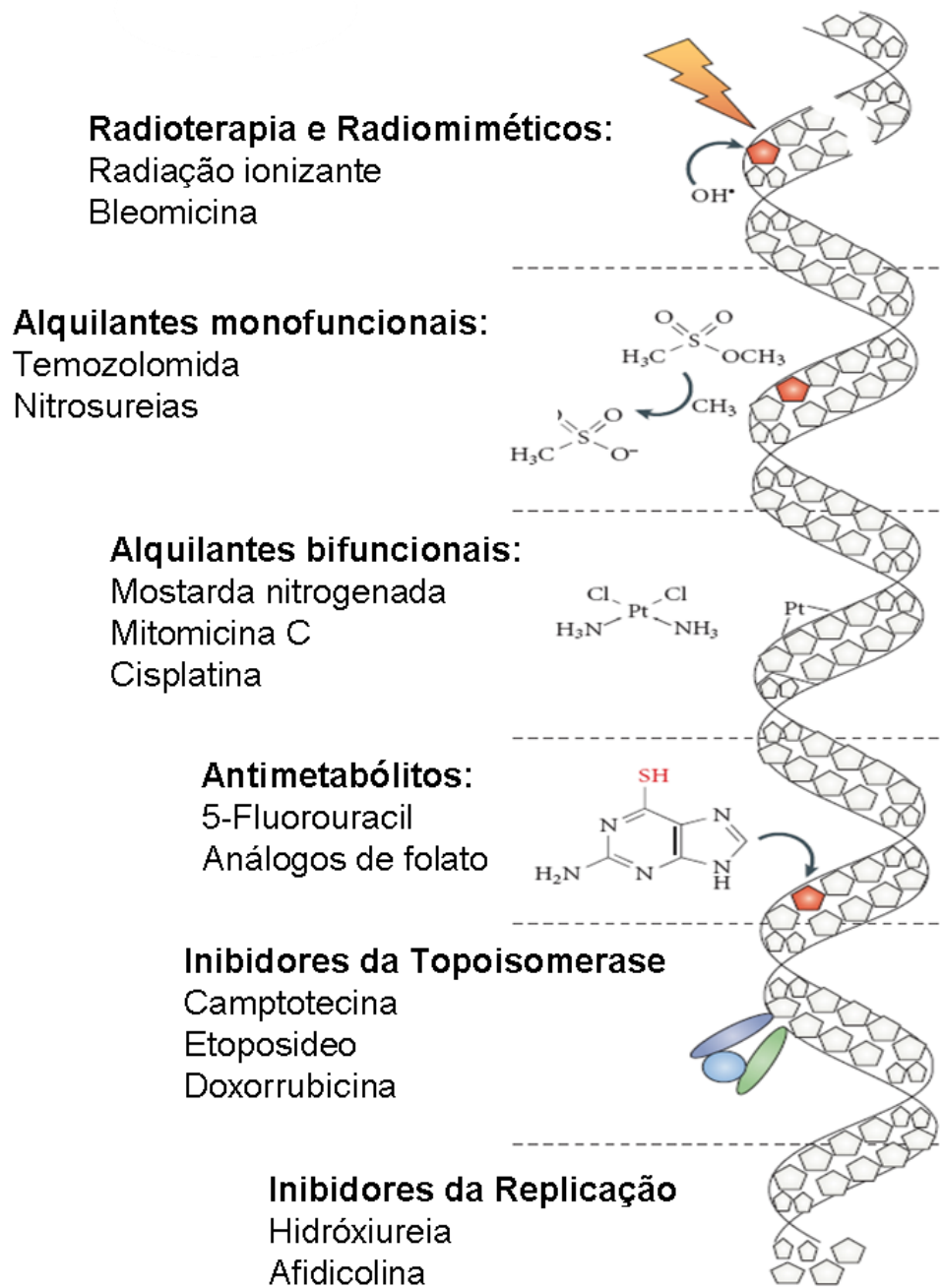


Figura 3. Tipos de lesões induzidas por medicamentos genotóxicos antitumorais e radioterapia (adaptado de Helleday *et al.*, 2008) .

1.1.2.1 Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes possuem a capacidade de se ligar covalentemente ao DNA, preferencialmente ao grupamento amino N7 de guaninas (Yang & Wang, 1999, Lenglet & Cordonnier, 2010). Estes compostos podem ser monofuncionais, formando adutos em um único sítio no DNA, como por exemplo, a temozolamida e trabectedina, ou bifuncionais, que se ligam em dois sítios no DNA, como a ciclofosfamida, clorambucila, melfalano, busulfano, mitomicina C e análogos da platina (Hurley, 2002, Mladenov *et al.*, 2007, Larsen & Escargueil, 2009). Os agentes bifuncionais também podem levar à formação de pontes covalentes com o DNA, os chamados *crosslinks*. Estas pontes podem ser feitas entre bases da mesma fita (pontes intracadeia) ou fitas opostas do DNA (pontes intercadeia) e ainda estas ligações podem ocorrer entre o DNA e proteínas (Helleday *et al.*, 2008). Como estas pontes bloqueiam a separação das fitas do DNA e impedem o acesso de várias enzimas ao DNA, este tipo de lesão pode levar ao bloqueio de processos fundamentais como a replicação, transcrição e reparação do DNA, levando conseqüentemente à morte celular (Mladenov *et al.*, 2007, Hlavin *et al.*, 2010). Os agentes alquilantes continuam sendo amplamente utilizados no tratamento do câncer e constituem a base de várias multiterapias, especialmente aquelas empregadas no tratamento de doenças linfoproliferativas. Dentre os novos agentes alquilantes, se destacam a trabectedina (Yondelis®) (Ganjoo & Patel, 2009) e a bendamustina (Treanda®) (Leoni *et al.*, 2008) entre outros.

1.1.2.2 Inibidores de topoisomerasas

As enzimas topoisomerasas (TOP) possuem múltiplas funções e desempenham papéis fundamentais nos processos de replicação, transcrição, recombinação, reparação do DNA e organização da cromatina. Particularmente, as topoisomerasas relaxam as tensões torsionais da dupla hélice do DNA quando as fitas são separadas durante a passagem das forquilhas da replicação e transcrição (Wang, 1996, Salerno *et al.*, 2010). Em humanos, a família das topoisomerasas é composta por seis enzimas, sendo que as enzimas TOP I e TOP II são os alvos principais de vários medicamentos antitumorais utilizados no tratamento de tumores de mama, pulmão, próstata e sarcomas (Larsen *et al.*, 2003). Por exemplo, os medicamentos antineoplásicos irinotecano, topotecano e belotecano inibem a enzima TOP I enquanto que doxorubicina, daunorubicina, etoposídeo e teniposídeo são inibidores da TOP II. Estes compostos agem estabilizando a ligação covalente formada entre o DNA e a topoisomerase induzindo a imobilização do complexo ou inibindo a ligação desta enzima ao DNA (Larsen & Escargueil, 2009, Saffi *et al.*, 2010, Salerno *et al.*, 2010). Atualmente, vários compostos que agem nas topoisomerasas estão sendo avaliados em ensaios clínicos, como por exemplo o gimatecano, lurtotecano e exatecano (Pommier *et al.*, 2010).

1.1.2.3 Antimetabólitos

Os agentes antimetabólitos são capazes de inibir enzimas nucleares necessárias para a síntese de nucleotídeos, e também podem ser incorporados no DNA e RNA, alterando suas estruturas (Larsen & Escargueil, 2009). Os antimetabólitos possuem estrutura similar aos nucleotídeos, moléculas

precursoras de nucleotídeos, ou co-fatores necessários para a síntese de nucleotídeos. Assim, os antimetabólitos atuam inibindo o metabolismo dos nucleotídeos, levando à diminuição dos estoques intracelulares destes (Grahan *et al.*, 1991, Helleday *et al.*, 2008). Os agentes metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU) foram introduzidos na terapia antitumoral na década de 1950 e são amplamente utilizados até o momento como agentes únicos ou em associação com outros compostos. O metotrexato, empregado no tratamento de vários tumores como carcinomas de mama, cabeça e pescoço, leucemia e linfomas, é análogo estrutural do ácido fólico. Este medicamento age inibindo a enzima diidrofolato redutase, que é essencial para a síntese de timidina, componente fundamental para a estrutura do DNA (Grahan *et al.*, 1991, Peters *et al.*, 2000, Banerjee *et al.*, 2002). Por outro lado, o 5-FU, como revisado em dois trabalhos recentes do nosso grupo (Matuo *et al.*, 2009 e 2010), é um medicamento utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, principalmente nos tumores de cólon e reto metastáticos, e que apresenta diferentes mecanismos de ação. Por ser análogo estrutural da uracila, o 5-FU é extensivamente incorporado como bases falsas na molécula de RNA, tanto no núcleo quanto no citoplasma, interferindo assim no processamento e função do RNA (Grem, 1997, Matuo *et al.*, 2009). Além disso, o principal metabólito do 5-FU, o monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina (FdUMP), tem a capacidade de inibir a enzima timidilato sintase, a qual é fundamental para a biossíntese de pirimidinas (Grem, 1997). Outros exemplos de compostos antimetabólitos utilizados na terapia antitumoral incluem a gemcitabina, capecitabina e pemetrexedo (Mini *et al.*, 2006, Silvestris *et al.*, 2010, Galetta *et al.*, 2010).

1.1.2.4 Antibióticos

Os antibióticos antitumorais atuam nas células de diferentes maneiras, como a intercalação no DNA ou geração de danos oxidativos. A bleomicina e a doxorubicina são exemplos de antibióticos que podem oxidar diretamente a molécula do DNA ou reagir com outros compostos celulares, como os lipídios, levando à formação de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio. Estes radicais livres podem, por sua vez, modificar as bases ou induzir quebras nas pontes de hidrogênio do DNA, levando à formação de sítios abásicos (Hurley, 2002, Granados-Principal *et al.*, 2010). A doxorubicina além de inibir a ação da topoisomerase, como citado anteriormente, também pode se intercalar entre as bases do DNA, causando alterações na dupla hélice. A dactinomicina, daunorrubicina e epirrubina são outros exemplos de antibióticos antitumorais intercalantes (Helleday *et al.*, 2008, Saffi *et al.*, 2009, Lenglet & Cordonnier, 2010).

1.1.3 Terapias-alvo

A quimioterapia tradicional, que utiliza principalmente medicamentos genotóxicos, exerce seus efeitos citotóxicos tanto nas células tumorais quanto nas normais. Basicamente, a seletividade da ação do medicamento é baseada na sensibilidade de células que possuem uma alta taxa de divisão celular. No entanto, várias células normais, como da mucosa oral, pele e do sistema gastrointestinal, apresentam uma capacidade de multiplicação igual ou superior a diversas células tumorais. Desta forma, o tratamento com medicamentos genotóxicos acarreta em vários efeitos adversos ao paciente. Além disso, o desenvolvimento de resistência tumoral aos fármacos é muito frequente em

diversos tipos de câncer, o que reforça a necessidade de novos agentes com um perfil terapêutico mais eficaz e seguro.

Nos últimos 20 anos, com o avanço do conhecimento sobre a biologia celular, molecular e genética, novas vias de sinalização que regulam atividades celulares como a proliferação e sobrevivência foram descobertas, sendo que muitas dessas mostraram ser radicalmente alteradas em células tumorais (Chabner & Roberts Jr, 2005).

No início dos anos 90 houve uma explosão na descoberta de terapias-alvo, o que impulsionou a transformação da pesquisa e desenvolvimento de drogas antitumorais, inicialmente financiadas com baixos investimentos por agências governamentais e universidades, em um negócio industrial de bilhões de dólares (Chabner & Roberts Jr, 2005). No período de 1990 a 2006, 920 moléculas antineoplásicas candidatas começaram a ser avaliadas em ensaios clínicos e dentre as aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration, USA), a maioria foram moléculas sintéticas inibidoras de cinases (Reichert & Wenger, 2008). Este cenário reflete o avanço das pesquisas que têm como foco principal o desenvolvimento de medicamentos que atuam em diferentes alvos nas células tumorais, as terapias-alvo. Dentre os principais alvos, os fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras, enzimas dos sistemas de reparação do DNA e proteínas envolvidas no ciclo celular, apoptose e angiogênese são os mais estudados até o momento.

O imatinibe (Glivec®) foi o primeiro composto antitumoral importante utilizado com terapia-alvo. Ele é um inibidor potente da enzima tirosina cinase BCR-ABL que é um produto da translocação cromossômica envolvida na patogênese da leucemia mielóide crônica (Druker *et al.*, 2001, Chabner &

Roberts Jr, 2005). Outros inibidores de cinases também foram aprovados pelo FDA para o tratamento do câncer, como o gefitinibe (Iressa®), empregado no câncer de pulmão de células não-pequenas, o sorafenibe (Nexavar®), usado no carcinoma de células renais e carcinoma hepatocelular, entre outros (Reichert & Wenger, 2008, Bailly, 2009, Larsen *et al.*, 2011).

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) também é alvo de alguns compostos, como o gefitinibe, e o anticorpo monoclonal cetuximabe (Erbix®), empregado no tratamento do câncer de cólon e reto e, mais recentemente, o lapatinibe, aprovado para o tratamento do câncer de mama. A angiogênese também se tornou um foco para várias moléculas como o anticorpo contra o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) bevacizumabe (Avastin®), que foi aprovado para o tratamento dos tumores de mama, cólon e reto e câncer renal (Reichert & Wenger, 2008, Larsen *et al.*, 2011).

Vários tumores mostram uma superexpressão das enzimas glutathione-S-transferases (GST), que representam a classe mais importante de enzimas de detoxificação envolvidas na indução de pré-resistência ou resistência adquirida a diversos medicamentos antineoplásicos. A pró-droga canfosfamida é um exemplo de fármaco que utiliza a ação da GST na sua atividade genotóxica, pois esta enzima converte a canfosfamida no produto ativo que se liga ao DNA (Tew, 2005). A canfosfamida está sob fase clínica I, II e III para o tratamento de tumores de ovário como agente único ou em combinação com outros medicamentos (Brüning & Mylonas, 2010). A brostalicina é outro exemplo de molécula que necessita da GST e da glutathione (GSH) para a sua ação antitumoral. Esta característica impulsionou os estudos com a brostalicina em

tumores que apresentam resistência a outros agentes, como a cisplatina, onde esta resistência é associada a altas quantidades de GST e GSH (Caponigro *et al.*, 2010).

Com a importância do DNA como molécula alvo de vários medicamentos antitumorais, não é surpreendente que a reparação do DNA seja um mecanismo importante na resposta terapêutica a esses agentes. Além disso, alguns tipos de tumores demonstram aumento na expressão de enzimas envolvidas na reparação do DNA que influenciam na resistência do tumor às drogas quimioterápicas (Helleday *et al.*, 2008). Por exemplo, a resistência apresentada frequentemente por gliomas ao tratamento com temozolamida é associada a altos níveis da enzima O-6-metilguanina metiltransferase (MGMT), que participa da reparação dos adutos no DNA induzidos por compostos alquilantes (Pegg, 2000, Hegi *et al.*, 2004, Minniti *et al.*, 2009). Baseando-se nestas observações, o grupo de Hegi e Stupp mostrou em vários trabalhos a importância da inibição da enzima MGMT na resposta tumoral aos agentes alquilantes (Hegi *et al.*, 2004 e 2005, Riemenschneider *et al.*, 2010, Sciuscio *et al.*, 2011). Os glioblastomas que apresentaram o promotor do gene *MGMT* metilado obtiveram uma melhor resposta terapêutica ao tratamento com temozolamida ou nitrosuréias, o que resultou no aumento da sobrevida dos pacientes tratados com estes agentes (Hegi *et al.*, 2004 e 2005, Riemenschneider *et al.*, 2010, Sciuscio *et al.*, 2011). Por outro lado, defeitos no reparo de mal emparelhamento de bases (*mismatch repair*) estão associados à resistência dos tumores a vários compostos genotóxicos, como agentes alquilantes monofuncionais e cisplatina. Desta forma, vários compostos que inibem enzimas envolvidas nos sistemas de reparação estão sendo

desenvolvidos com o objetivo de potencializar a eficácia ou especificidade de agentes que causam danos ao DNA (Helleday *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, as enzimas poli (adenosina difosfato ADP-ribose) polimerase (PARP), envolvidas no reparo por excisão de bases (BER), juntamente com as enzimas BRCA1 e BRCA2, implicadas no sistema de reparação por recombinação homóloga (HRR), revolucionaram as estratégias antitumorais, evidenciando a importância do reparo do DNA no tratamento do câncer (Underhill *et al.*, 2011). Até o momento, a família PARP conta com 17 membros, sendo que PARP1 e PARP2 destacam-se, principalmente PARP1, por desempenharem papéis importantes na reparação de quebras simples (*single strand breaks*, SSB) no DNA (Hoeijmakers, 2001, Flohr *et al.*, 2003). Com a inibição da PARP1, as SSB não são reparadas e são convertidas em quebras duplas (*double strand breaks*, DSB) no momento da replicação. Estas DSB, por sua vez, são reparadas principalmente pelo sistema de reparação por HRR, que é considerado um sistema livre de erro. Na ausência do HRR funcional, as DSB podem ser reparadas pelo sistema de reparação por recombinação não-homóloga (*non-homologous end-joining repair*, NHEJ). No entanto, o NHEJ é um sistema sujeito a erros que pode causar alterações na sequência do DNA no local das quebras favorecendo o surgimento de mutações (Hoeijmakers, 2001). Assim, em tumores deficientes em HRR, as DSB podem causar parada do ciclo celular, com consequente morte celular, ou ser reparadas pelo NHEJ, acarretando na instabilidade genômica e no surgimento de mutações secundárias (Underhill *et al.*, 2011).

Os efeitos antitumorais dos inibidores de PARP foram primeiramente identificados em pacientes com cânceres hereditários relacionados a

deficiências no HRR, principalmente tumores de mama que possuíam mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estes efeitos também foram demonstrados em células tumorais em cultura ou modelos xenográficos, onde os tumores deficientes nos genes *BRCA* foram extremamente sensíveis ao tratamento com inibidores de PARP (Underhill *et al.*, 2011). Além disso, a inibição da PARP1 induziu uma maior sensibilização de tumores deficientes no HRR aos efeitos citotóxicos de agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase, derivados platinados e radiação ionizante (Leung *et al.*, 2011). Atualmente, vários inibidores de PARP, como o veliparibe, iniparibe e olaparibe, estão sendo avaliados como agentes únicos ou em associação com outros compostos em ensaios clínicos no tratamento de diferentes tipos de câncer, como tumores de mama, ovário, cólon e reto, pâncreas e glioblastomas (Underhill *et al.*, 2011, Leung *et al.*, 2011).

1.2 Ecteinascidinas

As ecteinascidinas (ETs) são um grupo de alcalóides tetraidroisoquinolínicos extraídos do tunicado marinho *Ecteinascidia turbinata*, encontrado nos mares do Caribe e Mediterrâneo. As atividades antitumorais dos extratos da *E. turbinata* foram descobertas no final da década de 1960. No entanto, os compostos ativos foram purificados somente em 1990 (Rinehart *et al.*, 1990, Takebayashi *et al.*, 1999). Dentre várias moléculas, a ET-743 (trabectedina) foi a primeira molécula a ser selecionada para desenvolvimento, por apresentar seletividade e atividade citotóxica potente em baixas

concentrações na faixa pico ou nanomolar contra uma ampla variedade de células tumorais (Sakai *et al.*, 1992, Valoti *et al.*, 1998).

A trabectedina (ET-743, Yondelis®) é um agente alquilante e foi o primeiro composto originalmente derivado de uma fonte marinha aprovado para o tratamento do câncer (Ganjoo & Patel, 2009). Em 2007, a Comissão Europeia aprovou a utilização da trabectedina para o tratamento de sarcomas de tecidos moles avançados que não responderam às antraciclinas ou ifosfamida e em 2009, em combinação com a doxorrubicina lipossomal peguilada, a trabectedina obteve aprovação para o tratamento de tumores de ovário recorrentes e sensíveis à platina (D'Incalci & Galmarini, 2010). A trabectedina também foi designada como medicamento órfão pela Comissão Europeia e FDA para o tratamento de sarcomas de tecidos moles e tumores de ovário. Atualmente, este agente está em fase clínica II e III para outros tipos de tumores como próstata, mama, pulmão e tumores pediátricos (Schoffski *et al.*, 2007; Ganjoo & Patel, 2009, <<http://www.pharmamar.com/yondelis-spanish.aspx>>, acesso em 09/04/11). A trabectedina é desenvolvida pela empresa PharmaMar – Grupo Zeltia (Madri, Espanha) em parceria com a Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development LLC.

Em relação à estrutura química, a trabectedina é composta por três anéis tetraidroisoquinolínicos, chamados de subunidades A, B e C (Figura 4).

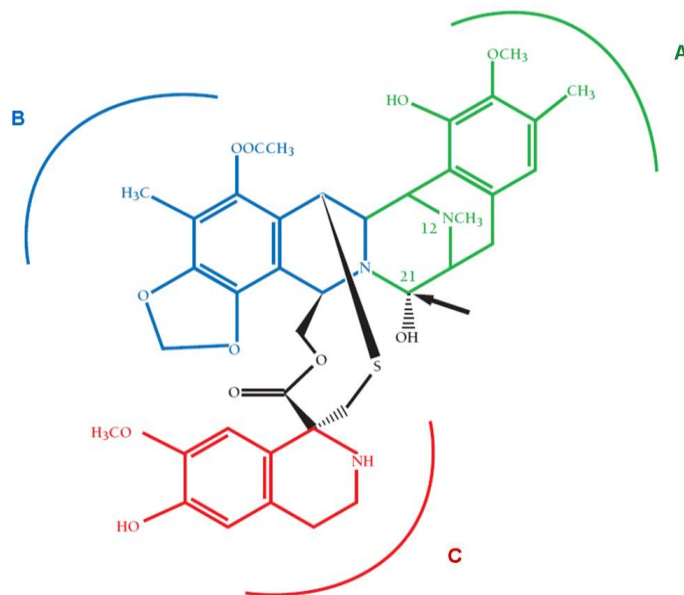


Figura 4. Estrutura química da trabectedina e suas subunidades. A seta indica o grupamento responsável pela alquilação ao DNA (adaptado de Scotto & Johnson, 2001).

As subunidades A e B estão envolvidas no reconhecimento e ligação à volta menor do DNA, enquanto a subunidade C localiza-se fora da volta menor e pode interagir com outras macromoléculas (Sakai *et al.*, 1992). Diferente de outros agentes alquilantes tradicionais que se ligam às posições N7 ou O6 de guaninas na volta maior do DNA, a trabectedina tem uma alta afinidade pelo grupamento amino N2 exocíclico de guaninas na volta menor do DNA, principalmente em regiões ricas em GC. O aduto resultante é estabilizado por pontes de van der Waals e de hidrogênio entre as subunidades A e B e nucleotídeos vizinhos na mesma fita do DNA ou em fitas opostas (Moore *et al.*, 1997, revisado em D'Incalci & Galmarini, 2010). Esta ligação gera uma torção da volta menor em direção à volta maior, fenômeno que diferencia a trabectedina de outros alquilantes que se ligam a volta menor do DNA (Pommier *et al.*, 1996, Zewail-Foote & Hurley, 1999, Soares *et al.*, 2007).

A ação alquilante da trabectedina e a consequente torção na hélice induzida pelo aduto trabectedina – DNA têm sido consideradas como fatores principais para a potente atividade citotóxica desse agente tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. Além de interferir fortemente na transcrição e replicação, alguns trabalhos mostram que a lesão induzida pela trabectedina é um substrato para as enzimas do sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER) (Vincenzi *et al.*, 2010).

De maneira interessante, a trabectedina, ao se ligar ao DNA, pode sequestrar enzimas do NER, como a XPG, formando um complexo trabectedina-DNA-NER (Damia *et al.*, 1996, Takebayashi *et al.*, 2001). A importância do NER na ação deste agente alquilante foi posteriormente reafirmada em diferentes modelos experimentais, como leveduras e linhagens tumorais, onde a ausência do NER funcional foi associada à diminuição da citotoxicidade da trabectedina (Zewail-Foote *et al.*, 2001, Soares *et al.*, 2005). Esta característica diferencia a trabectedina dos agentes alquilantes tradicionais que, na grande maioria, apresentam atividade citotóxica igual ou maior em células deficientes em enzimas envolvidas no NER (Casado *et al.*, 2008).

Além do NER, foi demonstrado que o sistema HRR também é importante na modulação da resposta celular à trabectedina. Em 2007, nosso grupo mostrou pela primeira vez em linhagens celulares que os adutos trabectedina-DNA são convertidos em lesões secundárias durante a replicação, principalmente DSB. Além disso, a trabectedina induziu um aumento na formação de aberrações cromossômicas em linhagens celulares deficientes em HRR em comparação com as células proficientes, reforçando o envolvimento

desta via na reparação das lesões induzidas pela trabectedina (Soares *et al.*, 2007). Esta hipótese foi reafirmada posteriormente por Tavecchio e colaboradores (2008) que, utilizando leveduras e células de mamífero em cultura, demonstraram que células deficientes em genes do HRR (*RAD51*, *BRCA2*, *XRCC2* e *XRCC3*) foram extremamente sensíveis à trabectedina. Neste estudo, também foi evidenciado que a formação de DSB é dependente da presença do sistema NER funcional (Tavecchio *et al.*, 2008). Ainda no ano de 2008, foi demonstrado que a trabectedina pode induzir a formação de DSB de maneira depende ou independentemente da replicação (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2008). Além disso, os autores relataram que o NER e o complexo MRN, bem como as enzimas ATM e DNA-PK, estariam envolvidas na resposta celular aos danos causados por este agente alquilante (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2008). Como o NER e HRR são vias que também são implicadas na reparação de *crosslinks* induzidos por vários agentes alquilantes e que a torção da volta menor do DNA em direção à volta maior induzida pela trabectedina poderia mimetizar este tipo de lesão, Casado e colaboradores (2008) investigaram a ação das enzimas envolvidas na reparação de *crosslinks* na resposta celular à trabectedina. Utilizando várias linhagens celulares proficientes e deficientes nas enzimas da família FA (Anemia de Fanconi), os autores mostraram que as células deficientes apresentam uma forte sensibilidade à trabectedina em comparação com as proficientes, confirmando a propriedade interessante da trabectedina como mimetizadora de *crosslinks*. Como este tipo de lesão ao DNA é um dos mais tóxicos existentes, esta propriedade poderia explicar a potente atividade citotóxica da trabectedina (Casado *et al.*, 2008).

Considerando estas importantes e promissoras atividades antitumorais da trabectedina, outros compostos similares foram sintetizados. Dentre estas moléculas, o PM00104 (Zalypsis®) e PM01183 (Tryptamicidin®) destacam-se por apresentar alta atividade citotóxica em modelos tumorais e, assim como a trabectedina, foram escolhidos para desenvolvimento pela PharmaMar (Madri, Espanha).

1.2.1 Zalypsis

O Zalypsis (PM00104, Figura 5) é um novo alcalóide produzido sinteticamente e se assemelha estruturalmente à trabectedina (Figuras 4 e 5). Quimicamente, o Zalypsis também possui similaridade a outros compostos de origem natural como a joromicina e às famílias Renieramicinas, Saframincinas e Safracinas (Yin *et al.*, 2005, Faircloth & Cuevas, 2006, Ocio *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2009).

Em relação às propriedades antitumorais, o Zalypsis mostrou atividade citotóxica potente em uma ampla variedade de linhagens celulares tumorais e em modelos xenográficos de câncer de mama, próstata, fígado, rim e tumores gástricos (revisado em Ocio *et al.*, 2009, Guillen *et al.*, 2009, Guillen *et al.*, 2009b). Este composto é desenvolvido pela PharmaMar e está atualmente em fase I e II de estudos clínicos para o tratamento de tumores sólidos e hematológicos e para o tratamento dos tumores de endotélio, cervical, bexiga e mieloma múltiplo (<<http://www.pharmamar.com/produtos.aspx>>, acesso em 09/04/11).

O Zalypsis possui as subunidades A e B presentes na trabectedina, descritas como responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao DNA. No entanto, este agente não apresenta a subunidade C da trabectedina que, nesta, localiza-se projetada para fora da volta menor do DNA e interage com proteínas e fatores de transcrição (Figuras 4 e 5, Moore *et al.*, 1997, Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009).

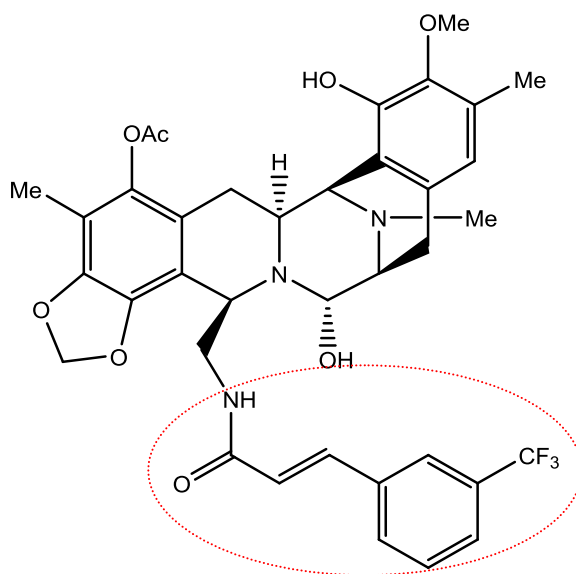


Figura 5. Estrutura química do Zalypsis (PM00104). A região circulada se refere à subunidade C do Zalypsis (adaptado de Leal *et al.*, 2009).

Em relação ao mecanismo de ação do Zalypsis, de maneira similar à trabectedina, este composto tem a capacidade de formar uma ligação covalente a guaninas da volta menor do DNA causando uma torção da hélice (Leal *et al.*, 2009). Entretanto, por ser um agente novo, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação envolvidos na resposta citotóxica do Zalypsis em células tumorais.

No primeiro relato quanto às bases moleculares associadas aos efeitos citotóxicos do Zalypsis, Faircloth e Cuevas (2006) citaram que este composto não ativa as sinalizações de resposta a danos ao DNA (*DNA damage response*, DDR). Entretanto, Leal e colaboradores (2009) demonstraram que a ação citotóxica do Zalypsis em linhagens celulares tumorais está associada à indução de quebras duplas, verificadas pelo ensaio cometa e pela indução de γ H2AX (histona H2AX fosforilada na serina 139), um marcador molecular de DSB (Redon *et al.*, 2002, Foster & Downs, 2005). Esta atividade foi confirmada em outros estudos que também analisaram a fosforilação de H2AX (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009, Ocio *et al.*, 2009, Colado *et al.*, 2010). Em linhagens celulares de leucemia mielóide aguda e de mieloma múltiplo, além da ativação de γ H2AX e de CHK2, o tratamento com o Zalypsis induziu alterações na expressão de genes envolvidos no reconhecimento de DSB, como *BRCA1*, *BRCA2* e *FA*, e também de genes implicados na reparação de DSB, como o *RAD51*, *RAD54*, *ATR*, *MSH6* e *MLH1* nestas células (Ocio *et al.*, 2009, Colado *et al.*, 2010). Recentemente, Guirouilh-Barbat e colaboradores (2009) observaram que células proficientes ou deficientes em enzimas do NER foram igualmente sensíveis ao Zalypsis e apresentaram níveis similares de γ H2AX, sugerindo que, ao contrário da trabectedina, esta via de reparação não exerce papel importante no mecanismo de ação do Zalypsis (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2008, Tavecchio *et al.*, 2008, Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009).

Em relação ao ciclo celular, o Zalypsis induziu acúmulo de células de mieloma múltiplo na fase G0/G1 após 24 horas de exposição a esse agente (Ocio *et al.*, 2009). Outras linhagens tumorais como de pulmão, cólon e mama mostraram acúmulo em fase S após o tratamento com o Zalypsis por 24 horas

(Leal *et al.*, 2009). No entanto, Colado e colaboradores não verificaram alterações no ciclo celular de células de leucemia tratadas com Zalypsis por diferentes períodos (Colado *et al.*, 2010). Desta forma, a ação do Zalypsis no ciclo celular é dependente do tipo de célula, concentração e período de exposição.

Quanto à indução de morte celular, os trabalhos publicados relatam a indução de apoptose de maneira dependente ou independente das vias das caspases (Ocio *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2009, Colado *et al.*, 2010). De maneira interessante, o Zalypsis ativa o processo de apoptose precocemente, como verificado pela marcação com anexina V em células de mieloma múltiplo após 3 horas de tratamento (Ocio *et al.*, 2009) e pela clivagem da caspase 9 em células de leucemia mielóide aguda após 6 horas de exposição ao Zalypsis (Colado *et al.*, 2010). Utilizando diferentes abordagens, nosso grupo também investigou os mecanismos de ação deste composto, cujos resultados serão discutidos no Capítulo I.

1.2.2 Tryptamicidin

O Tryptamicidin (PM01183, figura 6) é um composto novo derivado sinteticamente da trabectedina que apresenta estrutura química muito semelhante a esta. Ambos os agentes possuem as subunidades A e B idênticas, enquanto que a subunidade C composta por anéis tetraidroisoquinolínicos na trabectedina é composta por anéis tetraidrobetacarbolínicos no Tryptamicidin (Figuras 4 e 6, Leal *et al.*, 2010).

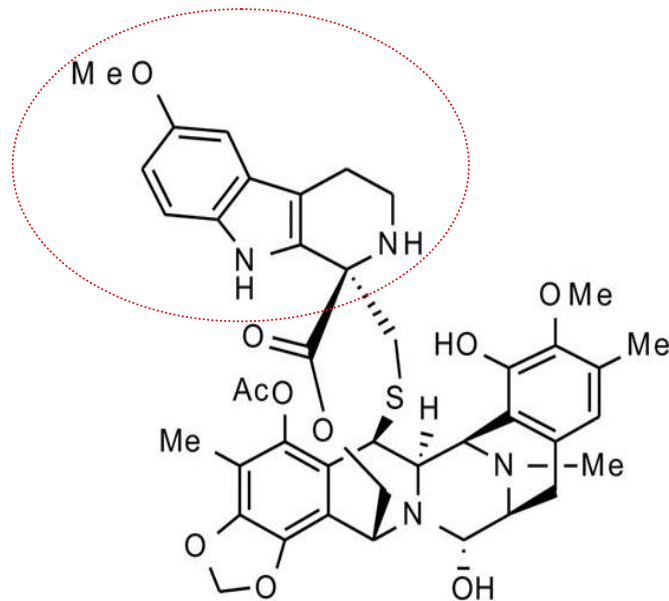


Figura 6. Estrutura química do Tryptamicidin (PM01183). A região circulada se refere à subunidade C do Tryptamicidin (adaptado de Leal *et al.*, 2010).

Este agente também é desenvolvido pela empresa PharmaMar e está atualmente em fase I de estudos clínicos para o tratamento de tumores sólidos (<<http://www.pharmamar.com/produtos.aspx>>, acesso em 09/04/11).

Assim como a trabectedina e o Zalypsis, o Tryptamicidin é um agente alquilante que se liga à volta menor do DNA e apresenta uma alta atividade citotóxica, com valores de IC_{50} na faixa nanomolar em vários modelos tumorais *in vitro* e *in vivo* (Moneo *et al.*, 2009, Aviles *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2010). Além disso, a ligação do Tryptamicidin ao DNA acarreta na formação de DSB, verificadas pela acumulação de *foci* de γ H2AX, que foram similares às quebras induzidas pela trabectedina (Moneo *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2010). Em relação aos efeitos do Tryptamicidin na progressão do ciclo celular, várias linhagens tumorais apresentaram acúmulo na fase S após o tratamento com esse agente. No entanto, a linhagem tumoral de ovário (IGROV₁) não demonstrou parada no

ciclo, devido provavelmente à morte celular excessiva induzida pelo Tryptamicidin (Leal *et al.*, 2010). Quanto aos mecanismos de morte celular, diferentes linhagens celulares tratadas com o esse composto entraram em processo de apoptose precocemente e esta parece ser dependente da via das caspases (Moneo *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2010).

No que se refere ao envolvimento dos sistemas de reparação de DNA na ação do Tryptamicidin, Aviles e colaboradores (2009) relatam que células deficientes no sistema NER apresentaram menor sensibilidade ao tratamento com o Tryptamicidin, indicando que a ação citotóxica desse agente está associada à presença do NER funcional, como verificado para a trabectedina (Casado *et al.*, 2008). Outra característica similar entre os dois compostos é o envolvimento do HRR na reparação das lesões resultantes dos adutos Tryptamicidin-DNA. Células deficientes nessa via mostraram ser 100 vezes mais sensíveis ao Tryptamicidin, quando comparadas às linhagens isogênicas proficientes (Aviles *et al.*, 2009).

Considerando que várias linhagens celulares resistentes à cisplatina apresentam um aumento na atividade de enzimas envolvidas no NER e que o Tryptamicidin poderia, assim como a trabectedina, interferir na ação do NER, nosso grupo investigou recentemente a atividade do Tryptamicidin em linhagens resistentes à cisplatina e oxaliplatina (Soares *et al.*, 2010). Como esperado, o Tryptamicidin inibiu a ação do NER, verificado pela inibição na reparação de lesões induzidas pelo UV que são substratos específicos desta via, e a associação do Tryptamicidin com a cisplatina resultou em uma ação no mínimo aditiva em células parentais ou resistentes à cisplatina (Soares *et al.*,

2010). Os resultados deste trabalho, assim como outros achados importantes, serão abordados no Capítulo II.

1.3 Compostos de selênio

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para mamíferos e, na forma de selenocisteína, faz parte da estrutura de várias proteínas, denominadas selenoproteínas. Aproximadamente 25 selenoproteínas já foram identificadas em humanos, dentre elas a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TR) que desempenham funções fundamentais na manutenção do equilíbrio redox celular (Allan *et al.*, 1996, revisado em Bhattacharya, 2011b). Além disso, o Se é um elemento importante na dieta, visto que a deficiência de Se no organismo é fortemente associada ao desenvolvimento das doenças de Keshan e Kashin-Beck. Em relação ao câncer, estudos epidemiológicos conduzidos nos últimos 50 anos apontam uma relação inversa entre o consumo de Se e a incidência de câncer (revisado em Valdiglesias *et al.*, 2010).

Os estudos desenvolvidos por Raymond Shamberger e Douglas Frost nos Estados Unidos, em 1969, estimularam o interesse na pesquisa do selênio para a prevenção do câncer (Shamberger & Frost, 1969). Desde então, muitos trabalhos foram realizados e a grande maioria destes envolveu a utilização de diferentes compostos de selênio na dieta e foram encontrados alguns resultados interessantes, como a diminuição da incidência de câncer de próstata, colo e reto e pulmão em homens acima de 60 anos nos Estados Unidos (revisado em Brozmanova *et al.*, 2010). No entanto, os dois estudos clínicos principais que analisaram os efeitos quimioprotetores do Se na dieta

divergiram sobre os resultados finais. O primeiro estudo (*Nutritional Prevention of Cancer Trial*) sugeriu que a ingestão do Se reduziu a mortalidade e o risco de câncer (Clark *et al.*, 1996). Por outro lado, o segundo estudo (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial – SELECT), que envolveu um maior número de pacientes, não obteve o mesmo resultado, o que não comprovou a ação quimiopreventiva da ingestão do Se (Lippmann *et al.*, 2009). Mesmo apresentando conclusões controversas, os efeitos antitumorais do Se foram relacionados principalmente com as atividades das selenoproteínas GPx e TR, as quais atuam no equilíbrio redox da célula (Lu & Jiang, 2005, Lobanov *et al.*, 2009, Selenius *et al.*, 2010).

Com os resultados quimioprotetores insatisfatórios e com alguns relatos de reações adversas da utilização do selênio na dieta, várias pesquisas utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* foram realizadas empregando o Se na terapia antitumoral. Vários compostos de Se naturais ou sintéticos como o seleneto, selenato, ácido metilsselenínico (MSA), selenometionina, selenocisteína, 1,4-fenileno-bis (metileno) selenocianato, difenilsseleneto e metilfenilsseleneto são exemplos de compostos selenados que têm sido avaliados quanto à prevenção e tratamento do câncer e também na proteção de tecidos saudáveis aos efeitos tóxicos de tratamentos radio e quimioterápicos (Fischer *et al.*, 2007, revisado em Bhattacharya, 2011b).

Dentre os principais resultados encontrados, os compostos de Se demonstraram interferir nos processos de angiogênese, ciclo celular e apoptose, sendo o metilsselenol considerado o principal metabólito com atividade antitumoral (Jiang *et al.*, 1999, Jiang *et al.*, 2000, revisado em Cao *et al.*, 2004, El-Bayoumy *et al.*, 2006). Com base nestas propriedades, estudos

recentes renovaram o interesse no potencial terapêutico desse micronutriente como adjuvante em tratamentos antitumorais convencionais.

Cao e colaboradores, utilizando modelos xenográficos de tumores de cabeça e pescoço e de cólon, investigaram a ação da metilselenocisteína e selenometionina, compostos precursores do metilsselenol, na modulação da atividade de vários medicamentos antitumorais utilizados clinicamente como a cisplatina, oxaliplatina, paclitaxel, 5-FU, doxorubicina e irinotecano. Neste trabalho, o Se protegeu contra a toxicidade induzida pelos medicamentos e demonstrou melhora na eficácia de todos os agentes, principalmente do irinotecano contra os tumores sensíveis ou resistentes a esse agente (Cao *et al.*, 2004). Esta resposta terapêutica sinérgica foi posteriormente atribuída ao aumento do transporte e distribuição do irinotecano propiciado pela ação do Se na vascularização tumoral (Bhattacharya *et al.*, 2009). Trabalhos recentes do mesmo grupo mostraram resultados importantes do Se no tratamento do câncer de cólon e reto, onde este micronutriente apresentou ação antiangiogênica e induziu melhoramento da maturação vascular, confirmando a eficácia terapêutica do Se neste tipo de neoplasia (Bhattacharya *et al.*, 2009 e 2011a).

Em outro estudo, o ácido metilsselenínico (MSA), também precursor do metilsselenol, aumentou a eficácia de paclitaxel contra o câncer de próstata refratário a hormônio *in vitro* e *in vivo* e esse efeito foi atribuído à indução de apoptose pelo MSA (Hu *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que células tumorais de cólon que possuíam a selenoproteína tioredoxina redutase (TR) atenuada apresentaram maior sensibilidade ao MSA, sugerindo que este

composto poderia ser particularmente eficiente no tratamento do câncer de cólon em combinação com agentes inibidores da TR (Honeggar *et al.*, 2009).

A ação do selênio na reparação do DNA também foi investigada em vários trabalhos. Fischer e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento com a selenometionina estimulou a atividade do NER em células expostas à radiação ultra-violeta (Fischer *et al.*, 2007). Mais tarde o mesmo grupo atribuiu esta resposta à ativação de XPC, envolvida no reconhecimento das lesões pelo NER global (Friedberg *et al.*, 2006, Smith & Kumar, 2009). Além disso, os autores mostraram que a ativação do NER pela selenometionina foi dependente da proteína P53 funcional (Fischer *et al.*, 2007). Considerando que vários tumores possuem a P53 não funcional, o Se estaria agindo seletivamente, melhorando o sistema de reparação de DNA somente em células normais (Fischer *et al.*, 2007). Esta ação seletiva do Se em células normais também foi verificada por Kim e colaboradores (2007), que demonstraram uma ação modulatória do Se na ativação do fator de transcrição Nrf2, conhecido por regular a atividade de várias enzimas antioxidantes como a GST, TR e peroxirredoxina. Neste trabalho, o Se induziu aumento na ativação da peroxirredoxina em células normais e, ao mesmo tempo, diminuiu a ativação desta enzima em células tumorais. Desta forma, a modulação do Nrf2 e das enzimas antioxidantes reguladas por este poderia estar envolvida na proteção de tecidos normais pelo Se contra as lesões causadas pelos compostos quimioterápicos (Kim *et al.*, 2007). Outro exemplo da atividade do Se na proteção de células normais foi relatado por Zhang e colaboradores, que mostraram a ação protetora do Se na toxicidade induzida pela cisplatina sem interferir na ação antitumoral deste agente (Zhang *et al.*, 2008). Estes autores

sugeriram que esta ação protetora do Se era devido principalmente à ação das enzimas antioxidantes, principalmente a tioredoxina, estimuladas pela ativação do fator de transcrição Nrf2 (Zhang *et al.*, 2008).

Recentemente, foi demonstrado que a selenometionina também atua na reparação das lesões induzidas pela bleomicina ou doxorubicina. Entretanto, esta ação se deve provavelmente aos efeitos antioxidantes deste composto organosselenado (Santos & Takahashi, 2008, Laffon *et al.*, 2010). No entanto, outros artigos relatam atividades inibitórias do Se no processamento de reparação de quebras duplas ou reparo associado à transcrição (revisado em Letavayová *et al.*, 2006).

Em resumo, estes resultados divergentes quanto às propriedades antioxidantes e antitumorais do Se podem ser atribuídos aos diferentes compostos de Se testados, orgânicos ou inorgânicos, assim como as diferentes concentrações utilizadas. No entanto, torna-se claro que este micronutriente tem a capacidade de modular várias funções celulares importantes, como a integridade genômica, envolvendo enzimas antioxidantes, sistemas de reparação do DNA e apoptose (Brozmanová *et al.*, 2010, Valdiglesias *et al.*, 2010). Além disso, estas atividades estariam diretamente associadas à habilidade do selênio em reagir com grupamentos tióis, corroborando com a hipótese de que a ação pró-oxidante do Se parece ser mais importante do que a antioxidante no tratamento antitumoral (Brozmanová *et al.*, 2010).

1.3.1 O composto 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto

O 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD, [(F₃CPhSe)₂]) é um composto orgânico de selênio de origem sintética e é análogo estrutural do difenil disseleneto (PhSe)₂ (Figura 7).

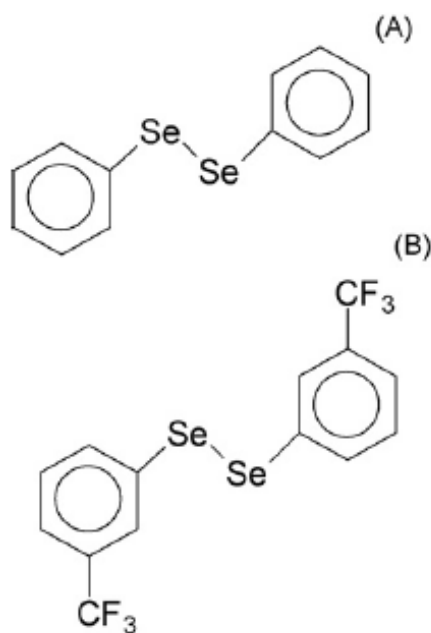


Figura 7. Estruturas químicas dos compostos organosselenados. A) difenil disseleneto e B) 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (Machado *et al.*, 2009).

O difenil disseleneto é um composto orgânico de selênio que possui interessantes propriedades farmacológicas, destacando-se principalmente como hepato e neuroprotetor (revisado em Rosa *et al.*, 2007). Basicamente, as atividades protetoras do difenil disseleneto são relacionadas às suas funções antioxidantes demonstradas *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, assim como outros compostos de Se, o difenil disseleneto também pode agir como pró-oxidante, reagindo com tióis celulares como a GSH e enzimas que contêm tióis na sua estrutura (Rosa *et al.*, 2007, Kade & Rocha, 2010). Esta atividade pró-oxidante foi associada a toxicidade e genotoxicidade induzidas pelo difenil disseleneto,

principalmente quando utilizado em altas concentrações, em diferentes modelos experimentais, como bactérias, leveduras e camundongos (revisado em Rosa *et al.*, 2007).

Diferente do seu análogo difenil disseleneto, poucos trabalhos foram publicados em relação à atividade biológica do DFDD. Os primeiros estudos sobre o DFDD avaliaram a ação deste composto como neuroprotetor em diferentes modelos animais. O grupo de Nogueira e colaboradores demonstrou que o DFDD não induziu episódios convulsivos em camundongos e protegeu células cerebrais de camundongos e ratos contra a lipoperoxidação, afirmando a ação antioxidante deste composto (Nogueira *et al.*, 2003, Meotti *et al.*, 2004). Utilizando um modelo experimental de esquizofrenia, nosso grupo demonstrou que o DFDD protegeu contra a estereotipia induzida por apomorfina em camundongos, sem afetar outros parâmetros neurocomportamentais como a ansiedade, locomoção, motivação e memória (Machado *et al.*, 2006). Como a apomorfina induz estresse oxidativo em células cerebrais de camundongos, a ação protetora do DFDD contra a estereotipia induzida por esse agente também poderia estar relacionada a propriedades antioxidantes do composto organosselenado (Machado *et al.*, 2006). O DFDD também apresentou efeitos anticonvulsivos em camundongos expostos ao pentilenotetrazol (PTZ) e esta atividade foi relacionada à diminuição da recaptação do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) pelas células cerebrais (Prigol *et al.*, 2009). Recentemente, Brüning e colaboradores evidenciaram que o DFDD apresenta propriedades ansiolítica, antinociceptiva e antidepressiva em camundongos, sugerindo a atividade do DFDD na modulação dos sistemas serotoninérgicos e opioides (Brüning *et al.*, 2009, 2010, 2011).

Com base nos efeitos pró-oxidantes, genotóxicos e mutagênicos do difenil disseleneto em bactérias, linhagens de levedura e células em cultura, nosso grupo investigou as atividades do DFDD nos mesmos modelos experimentais, cujos resultados serão discutidos no capítulo III.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Neste trabalho procurou-se elucidar os mecanismos de ação dos novos produtos Zalypsis, Tryptamicidin e 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD), principalmente quanto as suas atividades na maquinaria macromolecular, visando a aplicação destes agentes na terapia antitumoral.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade citotóxica do Zalypsis e do Tryptamicidin em diferentes linhagens celulares normais ou tumorais;
- Investigar a ação genotóxica do Zalypsis e do Tryptamicidin utilizando ensaios de detecção de quebras simples e duplas no DNA;
- Analisar o envolvimento dos sistemas de reparação de DNA, principalmente o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o reparo por recombinação homóloga (HRR) nas respostas citotóxicas dos agentes Zalypsis e Tryptamicidin usando linhagens celulares proficientes e deficientes nestes sistemas;
- Estudar os efeitos do Zalypsis e do Tryptamicidin na progressão do ciclo celular bem como nas vias de *checkpoint* em linhagens tumorais utilizando citometria de fluxo e imunocitoquímica;
- Avaliar a ativação de apoptose em linhagens tumorais expostas ao Zalypsis e Tryptamicidin empregando as técnicas de citometria de fluxo e imunocitoquímica;

- Verificar a atividade genotóxica e antígenotóxica do DFDD em fibroblastos de pulmão de hamster chinês – células V79;
- Investigar a ação mutagênica e antimutagênica do DFDD em linhagens de *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar se o DFDD é capaz de mimetizar a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase analisando os efeitos diretos do DFDD sobre espécies reativas de oxigênio *in vitro*.

CAPÍTULO I

THE DNA MINOR GROOVE BINDER ZALYPSIS INDUCES EARLY APOPTOSIS WITHOUT TRIGGER DNA DAMAGE RESPONSE IN TUMOR CELLS

Artigo a ser submetido para a revista *Clinical Cancer Research*

Neste Capítulo, será ilustrado o manuscrito elaborado sobre os mecanismos de ação do agente alquilante antitumoral Zalypsis em linhagens celulares normais e tumorais principalmente em relação à maquinaria macromolecular que será submetido ao periódico *Clinical Cancer Research*. Dentre os resultados mais relevantes, destaca-se a potente atividade citotóxica do Zalypsis em diferentes linhagens tumorais, mesmo quando utilizado em baixas concentrações e em curtos períodos de tratamento. Utilizando os ensaios cometa e incorporação de EdU, foi possível detectar que o tratamento com o Zalypsis levou à formação de quebras duplas no DNA de maneira dependente de replicação e, além disso, mostrou inibir a replicação. Diferentemente de outros agentes antitumorais que possuem o DNA como alvo principal, o Zalypsis parece não ativar a sinalização de resposta a danos no DNA (*DNA damage response*). Como verificado por citometria de fluxo e imunocitoquímica, células tumorais expostas ao Zalypsis em concentrações que bloqueiam a replicação, não apresentaram parada no ciclo celular e, de maneira precoce, mostraram acúmulo na fase sub-G1 e sinalização de morte celular. Estes resultados possibilitaram a elucidação das primeiras respostas celulares frente ao tratamento com o Zalypsis e ressaltam as promissoras atividades citotóxicas desse agente antitumoral.

THE DNA MINOR GROOVE BINDER ZALYPSIS INDUCES EARLY APOPTOSIS WITHOUT TRIGGER DNA DAMAGE RESPONSE IN TUMOR CELLS

Miriana S. Machado^{1,2,3}, Daniele G. Soares^{1,2}, Carlos Galmarini⁴, Alexandre E. Escargueil^{1,2}, João Antonio P. Henriques³, Annette K. Larsen^{1,2}.

¹Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938, Paris 75012, France.

²Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ. Paris 06), Paris 75005, France.

³Department of Biophysics/Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, Brazil.

⁴Cell Biology Department, PharmaMar, Madrid 28770, Spain.

Running title: Zalypsis induces early apoptosis without DNA damage response activation.

Key words: Zalypsis, cytotoxicity, DSB, apoptosis

Adress correspondence to Dr. Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics Laboratory, Kourlinsky Building, Hôpital Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris cedex, France. akraghlarsen@aol.com

ABSTRACT 239 words (not to exceed 250 words)

Purpose: Zalypsis is a new covalent minor groove binder structurally related to ET-743 that has demonstrated potent cytotoxic activity in wide variety of haematological and solid tumor cell lines and in murine xenograft models as breast, prostate, liver, gastric and bladder. Cytotoxic activities of Zalypsis have been associated to induction of DSB, cell cycle arrest and apoptosis in different cancer cell lines. We here characterize the early cellular responses to Zalypsis in ovarian and cervical cancer cells.

Experimental Design: The cytotoxic activity of Zalypsis in different cell lines was determined by the MTT viability assay. DNA strand break induction was determined by comet assay, immunofluorescence and flow cytometry using specific antibodies. The Zalypsis effects on cell cycle progression were verified by flow cytometry.

Results: All cell lines demonstrated high sensitivity to Zalypsis which displayed IC_{50} values at nM range. In addition, this drug was able to provoke DSB in cycling cells, but in a lower level when compared to others DNA-damaging drugs. Even the replication inhibition induced by Zalypsis, no cell cycle perturbation was observed. However, Zalypsis treatment was accompanied by early sub-G1 cells accumulation and caspase-3 activation. Interestingly, strong Zalypsis exposure showed γ H2AX and cleaved-caspase-3 colocalization.

Conclusions: We here characterize the tumor cell response to low doses of Zalypsis for short exposure periods. Our results suggest that Zalypsis is a potent cytotoxic drug with interesting proprieties involving fast cell death and no traditional DNA damage response activation.

INTRODUCTION

Most of the anticancer chemotherapeutic drugs that are broadly and successfully used today are DNA damaging agents. DNA minor groove binders (MGBs) are a class of compounds that have the ability of recognise and bind to DNA minor groove with significantly greater DNA sequence selectivity than the classical alkylating agents (1,2). This class comprises agents useful therapeutically and also molecules used as tools for molecular biologic research. Besides the antiprotozoal, antiviral and antibacterial properties, MGBs have shown potent cytotoxic activities that stimulated the research focus on developing of these drugs as anticancer agents (2-4). Currently, MGBs as irifolven, brostallicin and PM001183 are under clinical trials as single agents or in association to others conventional antineoplastic drugs (5,6), whilst the mitomycin C and trabectedin are the more clinically important MGB approved as chemotherapeutic agents (2,5).

Trabectedin (ET-743, Yondelis®, Figure 1A) is a tetrahydroisoquinoline alkaloid derived from the Caribbean sea squirt *Ecteinascidia turbinata* that shows potent antitumoral activities against a variety of tumor models. This drug has obtained marketing authorizations from the European Commission (EC) in 2007 for the treatment of advanced soft tissue sarcoma after failure of anthracyclines and ifosfamide, and in 2009 for the treatment of platinum-sensitive ovarian cancer in combination with pegylated liposomal doxorubicin (7). Currently, ET-743 is under phase I, II and III clinical trials for others tumors as prostate, breast and pediatric sarcomas (2,8). In relation to the mechanism of action, ET-743 interacts with the minor groove of DNA and alkylates guanine at the N2 position, which bends toward the major groove. Finally, the structure shows like a functional interstrand cross-link (reviewed in 9). Noteworthy, the direction of bending is a novel feature among DNA minor groove-interactive agents, making this compound unique. The alkylating action of ET-743 is characterized as the principal feature for the ET-743 potent cytotoxic activity against various *in vitro* e *in vivo* cancer models. As consequences of the ET-743–DNA adducts, it has been reported the induction of DNA double strand breaks (DSB), inhibition of transcription and replication and nucleotide excision (NER) and homologous recombination (HR) repair pathways involvement (7,9).

Since the interesting cytotoxic properties of the ET-743, several ET-743 analogues have been synthesized and Zalypsis is a promising molecule that is under development.

Zalypsis® (PM00104, Figure 1B) is a new covalent minor groove binder structurally related to ET-743. This drug is a synthetic alkaloid that is also related to marine compounds Jorumycin, Renieramycins, Saframycins and Safracins (10-12). Zalypsis has demonstrated potent cytotoxic activity in wide variety of haematological and solid tumor cell lines and in murine xenograft models as breast, prostate, liver, gastric and bladder (reviewed in 11). Zalypsis is developed by PharmaMar (Madrid, Spain) and is currently under clinical phase I and II in patients with advanced and/or metastatic endometrial, cervical cancer previously treated with one line of systemic chemotherapy, multiple myeloma, solid and haematological tumors (11,13).

Zalypsis has the A and B units of ET-743 described as responsible for ET-743-DNA binding, but it lacks the C unit that in the former protrudes out the minor groove and interacts with proteins and transcription factors (Figure 1 and 2) (14,15). Indeed, similarly to ET-743, Zalypsis covalently binds to guanines in the DNA minor groove and the resulting complex is stabilized by hydrogen bonds that further stabilize the DNA molecule (12). Thus, as consequence of alkylating action of Zalypsis, it has been recently demonstrated the induction of DSB followed by cell cycle arrest and apoptosis in different cancer cell lines (11-13,15). However, all studies have employed very high concentrations among 2 to 50 times the IC₅₀ of Zalypsis and/or longer treatments that might over stimulate the cell machinery and mask the original cell answer to Zalypsis. In this sense, our study is focused on the mechanism of action of Zalypsis at lower concentrations and short time treatments in different cell lines emphasizing the early DNA damage response activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals, Reagents and Cells.

Zalypsis® was provided by PharmaMar (Madrid, Spain). The acronycine derivative S23906 was obtained from Institut de Recherches Servier (Croissy

sur Seine, France), while the camptothecin active metabolite SN-38 was purchased from Abatara technology (Xi'an, China). Bleomycin sulfate was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). γ H2AX (# 05-636) directed antibody was purchased from Millipore (Lake Placid, NY). Cleaved-caspase-3 (# 9661) –directed antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Fluorescent dye-conjugated antibodies were purchased from Jackson Immunoresearch (BarHarbor, ME). V79B cells were generously provided by Malgorzata Zdzienicka (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). Nonproliferating lymphocytes were isolated from the peripheral venous blood of healthy donors by Ficoll centrifugation according to standard procedures (16). HeLa-M cervical carcinoma cells were a gift from Andrzej Skladanowski (Gdansk, Poland). IGROv₁ ovarian carcinoma cells were provided by Alain Pierré, (Croissy sur Seine, France) whereas A2780 ovarian carcinoma cells were kindly provided by Robert Brown (Bearsten, UK), HT-29 colon carcinoma cells were obtained from Richard Camalier (National Cancer Institute, US) whereas the HCT-116 colon carcinoma cells were a gift from Bert Vogelstein (Baltimore, MD). HeLa-M, HT29, MRC5 or V79B cells were maintained in Dulbelcco's modified Eagle's Medium whereas HTC116 cells were maintained in McCoy's 5A medium (InVitrogen, Cergy-Pantoise, France). IGROv₁, A2780 and PBL cells were grown in RPMI-1640 medium (InVitrogen). All media were supplemented with 5 % of fetal calf serum (Perbio Science, Brebières, France), 2 mmol/L L-glutamine (Eurobio, Les Ulis, France), 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (PanPharma, Fougères, France). All cell lines were regularly tested for *Mycoplasma* contamination using Mycoplasma Detection Kit Myco Alert® (Catalog # LT07-318, Lonza, Basel, Switzerland).

Viability Assays.

The cytotoxic activity of Zalypsis was measured by the tetrazolium-based MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay as previously described (17). Cells were exposed to Zalypsis for 1 hour followed by 4 generation doubling times in drug-free medium. All values are averages of at least three independent experiments, each done in duplicate.

Comet Assay.

The neutral comet assay detects double strand breaks (DSB) whilst the alkaline version is able to detect single strand breaks (SSB), DSB, alkali-labile sites and cross-links (18,19). V79B and lymphocytes were exposed to the indicated drug concentrations at 37°C in the dark and analyzed by neutral and alkaline version, respectively, immediately according to previously published procedures (20,21). Image analysis was performed by using Komet 5.5 software (Kinetic Imaging, Nottingham, U.K.). At least 100 cells were analyzed per sample. Values represent the average of at least two independent experiments.

Cell Cycle Analysis.

Cell cycle was determined by flow cytometry analysis as described previously (22). Cells were plated in Petri dishes overnight before Zalypsis treatment and incubated in drug-free media for indicated periods. Then, cells were washed, fixed with 70 % ethanol and incubated with antibodies when indicated. Cells were resuspended in PBS and incubated for 30 minutes at room temperature in a solution containing 100 µg/mL RNase (Sigma-Aldrich) and 5 µg/mL DAPI (Sigma-Aldrich). Samples were analyzed with a LSR II flow cytometer and DIVA software (BD Biosciences, France). Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

Immunofluorescence and Microscopy.

Cells were plated onto coverslips and grown overnight before treatment with Zalypsis. Lymphocytes were treated with Zalypsis and fixed onto coverslips by cytospin (4 min at 265 g, Cytofuge 2; Statspin, Norwood, MA). After treatments for indicated times, cells were fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS/Triton X-100 (0.5%). Coverslips were saturated in presence of PBS+ (PBS containing 1% BSA and 0.2% gelatin; Sigma), and antigens were revealed by immunolabeling using the indicated primary antibodies. DAPI was added to label DNA (Vectashield, Vector). Replicating cells were labeled by incorporation of EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) (Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit, # C10337, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 30 minutes prior to drug addition. EdU

labeling was carried out according manufacturer's instructions. Images were collected using a BX61 microscope and cell F imaging software (Olympus). Fluorescence intensities were measured by using MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA). Background over non cellular regions was subtracted. At least 200 cells were analyzed by sample and the values represent the averages of at least two independent experiments.

RESULTS

Zalypsis shows potent cytotoxic activities toward several cell lines.

V79B and MRC5 normal fibroblasts or HeLa-M cervical, IGROv₁ and A2780 ovarian, HT29 and HCT116 colon cancer cells were treated with Zalypsis for 1 hour followed by 4 days post-incubation in drug-free media. As verified by MTT assay, Zalypsis demonstrated potent cytotoxic activity with IC₅₀ values at nm range for all cell lines tested (Figure 2, Supplementary Fig. S1).

Zalypsis induces DSB in a replication-dependent manner

V79B normal hamster fibroblast cells were exposed to several concentrations of Zalypsis for 1 hour and the cells were collected for the neutral comet assay, a sensitive technique for detect DNA DSB. Analyzing the percentage of the total DNA that was in the tail of the comets (DNA tail %), it was verified that Zalypsis is able to induce DSB in a dose-response manner (Figure 3A). In addition, DSB-induced Zalypsis were also detected by γ H2AX labeling, a known molecular mark of DSB (23). IGROv1 ovarian tumor cells were exposed to several concentrations of Zalypsis for 1 hour and the γ H2AX labeling was analyzed by flow cytometry. Indeed, although in a lower level than S23906 or bleomycin cytotoxic agents (24,25), Zalypsis-treated cells showed γ H2AX signal (Figure 3B). However, contrasting results were found in nonproliferating lymphocytes. No significant DNA breaks formation was detected in Zalypsis-treated lymphocytes even using the highly sensitive alkaline comet assay (Figure 3C). In addition, in contrast to cell cycle-independent genotoxic agent bleomycin (24), no γ H2AX signal was observed in

Zalypsis-treated lymphocytes (Figure 3D). Taken together, these findings suggest a strict requirement for DNA replication in the induction of DSB by Zalypsis.

Zalypsis is able to inhibit DNA replication in ovarian tumor cells

As described for others alkylating agents, the DSB induced by ET-743 are believe to occur when the replication fork machinery find the ET743-DNA adduct (20). Furthermore, ET-743 is also able to inhibit DNA replication (20). Considering the cycling-dependent genotoxic action of Zalypsis, we have hypothesized that Zalypsis-DNA adducts might also impair the fork replication progression. For this propose, we investigated the influence of Zalypsis treatment on DNA replication by using EdU incorporation, a chemical method for fast detection of DNA synthesis (26). IGROv1 cells were pre-incubated with EdU, a thymidine analog, for 30 min prior the treatment with different concentrations of Zalypsis for 1 hour. As expected, Zalypsis exposure was accompanied by decreasing of DNA synthesis in a dose-dependent manner, as verified by EdU signal (Figure 4, Supplementary Fig. S2). These results suggest that as ET-743 (20), Zalypsis is able to inhibit the DNA replication.

No cycle perturbations is provoked by Zalypsis in cervical or ovarian tumor cell lines

To investigate whether the growth inhibition provoked by Zalypsis was due to alterations in cell cycle progression, HeLa-M and IGROv1 cells lines were exposed to IC₅₀ concentrations of Zalypsis for 1 hour and post-incubated for 6, 14, 24 and 48 hours in drug-free media. Analyzed by flow cytometry, Zalypsis did not induce significant changes in the cycle phases in any cell lines tested (Figure 5). To reinforcing this observation, IGROv1 cells were treated with the alkylating agent S23906 that has the ability of trigger S phase arrest (27,28). Interestingly, this compound was able to increase the S phase sub-population, whilst Zalypsis did not (Figure 6). On the other hand, even without cell cycle arrest induction by Zalypsis treatment, sub-G1 population increasing was detected after 6 and 14 hours of post-incubation in HeLa-M and IGROv1 cells, respectively (Figure 7).

Zalypsis markedly triggers apoptosis by caspase-dependent manner

Since Zalypsis is able to provoke accumulation of sub-G1 HeLa-M cells after 1 hour of treatment followed by 6 h of post-incubation, we investigate the involvement of caspase pathway by caspase-3 activation, a final caspase effector (29), in the Zalypsis-induced cell death. According to sub-G1 results (Figures 5A and 7A), HeLa-M cells exposed to Zalypsis for 1 hour showed caspase-3 cleavage after 6 h of post-incubation in drug-free media analyzed by cleaved-caspase-3 flow cytometry detection (Figure 7B). Taken together, the caspase pathway is involved in the strong cell death induced by Zalypsis.

DSB induced by Zalypsis is not a early DNA damage response, but late signals in apoptosis process

Zalypsis is able to provoke DSB in normal or tumor cell lines, as verified by the comet assay in V79B cells and flow cytometry or immunofluorescence in IGROv1 cells. However, even at high concentrations or longer treatment time, Zalypsis induces a weak γ H2AX formation. Furthermore, early apoptosis induction was detected in Zalypsis treated cells. Thus, using bidimensional flow cytometry, γ H2AX and caspase-3 activations were concomitantly analyzed in HeLa-M cells treated with high concentration of Zalypsis (750 nM) for 1, 3 or 6 hours of incubation. Indeed, Zalypsis was able to significantly increase the H2AX phosphorylation after 3 hours of incubation (Figure 8A). Noteworthy, about 63 % of positive γ H2AX cells treated with Zalypsis for 6 hours showed caspase-3 activation (Figure 8B). Interestingly, cleaved-caspase-3- γ H2AX colocalization was observed in a lesser extension (about 13 %) in cells exposed to the antitumoral drug SN-38 (30), reinforcing the specific action of Zalypsis (Figure 8B, Supplementary Fig. S3).

DISCUSSION

Zalypsis is a new DNA-alkylating agent with strong cytotoxic and antitumor activities. This drug alkylates DNA on guanine's exocyclic amino group located in the minor groove of the DNA helix (12). Interestingly, as ET-

743 and S23906, Zalypsis contrasts with important antitumoral drugs used in traditional chemotherapy, as cisplatin and nitrogen mustards, which react with guanines in the DNA major groove (6,7,31).

Recently, it has been reported that Zalypsis present similar cytotoxic profile to its structural analog ET-743, including DNA breaks, cell cycle arrest and apoptosis induction (7,11-13,15). In contrast, little is known about the early cellular response to Zalypsis. Thus, in the present study, we investigate the cell machinery involved in the cytotoxic activity of Zalypsis at low doses, about IC₅₀ concentrations and short treatments in different cell lines.

Zalypsis, as ecteinascidin analogs ET-743 and PM01183, displayed potent cytotoxic activity toward different cell lines. Normal or tumor cells were exposed to Zalypsis for 1 hour and analyzed by MTT assay after 4 doubling time incubation in drug-free media. As expected, Zalypsis showed IC₅₀ values in low nM range in all cell lines (Figure 2, Supplementary Fig. 1), mostly in tumor cells, confirming the potent antitumor profile of this drug even at short treatment times. In addition, these cytotoxic effects were accompanied by a rapid DNA strand breaks formation. Using the comet assay and γ H2AX labeling, normal (V79B) or tumor (IGROv1) cell lines showed DSB formation after Zalypsis exposure. However, this effect was weaker when compared to the potent antitumor drugs bleomycin and S23906 in IGROv1 cells (Figures 3A and 3B). DSB induced by ET-743 is reported as a secondary lesion which takes place after fork replication blockage by ET-743-DNA adducts, emphasizing the replication-dependent genotoxic action of this drug (20). Thus, nonproliferating lymphocytes were treated with Zalypsis by 1 hour and the presence of DSB was analyzed. In contrast of the direct genotoxic agent bleomycin (24), Zalypsis was not able to induce DSB in these cells, as verified by absence of DNA fragments and γ H2AX signal (Figure 3C and 3D). Taken together, DSB-induced Zalypsis is also replication dependent.

Cytotoxic activities of DNA-alkylating drugs, as cisplatin, mytomicin C and ET-743, are often associated to replication blockage and cell cycle arrest (20,32,33). To further analyze the Zalypsis effects on DNA replication, EdU thymidine analog incorporation was used to measure DNA synthesis in IGROv1 cells. Accordingly, Zalypsis exposure for 1 hour was able to decrease DNA replication in a dose-dependent manner (Figure 4). On the other hand, no

perturbation in the cell cycle progression was observed in tumor cells treated with Zalypsis. Ovarian and cervical cancer cell lines were exposed to IC₅₀ Zalypsis doses for 1 hour and incubated in drug-free media for 6, 14, 24 or 48 hours. Regardless the replication inhibition action of Zalypsis, no cell cycle arrest was induced by this drug as verified by flow cytometry (Figure 5). In the same time, the novel minor groove binder S23906 was able to induce a significant S phase cell arrest (Figure 6), corroborating with recent findings (28).

Interestingly, even though no cell cycle arrest induction was demonstrated by Zalypsis, HeLa-M and IGROv1 cells treated with IC₅₀ doses of this drug showed early sub-G1 phase accumulation (Figures 5 and 7A). It has been described that IGROv1 cells are highly sensible to Zalypsis, showing fast cell death (12). Moreover, multiple myeloma, lung and colon cell lines also presented sub-G1 accumulation after Zalypsis treatment (13). Nevertheless, high Zalypsis doses and about 6 – 48 hours of exposition have been employed in these works (12,13). Thus, our results demonstrate that 1 hour of Zalypsis treatment is enough to trigger cell death involving apoptosis activation. HeLa-M cells exposed to Zalypsis showed cleaved-caspase-3 increasing in a similar manner to sub-G1 population accumulation (Figure 7).

ATM (ataxia-telangiectasia mutated) and ATR (ATM RAD3-related) are the most important players involved in the cell cycle checkpoint following DNA damage or replication stress (34). Moreover, these effector kinases are implicated in H2AX phosphorylation after DSB formation (35,36). Since Zalypsis blocks the DNA synthesis and induces γ H2AX labeling, it was expected the involvement of these kinases in the cell response to this alkylating agent. Noteworthy, no activation of ATM or ATR pathways were observed after Zalypsis exposure (data not shown). These results corroborate with the absence of cell cycle arrest, even at Zalypsis concentrations able to provoke cell death. However, the γ H2AX-induced Zalypsis presented here and described by previous studies are not explained (12,13,15).

DSB may be produced either directly or indirectly, by direct action of ionizing radiation as well as antitumor drugs bleomycin and etoposide or by single strand breaks are converted in DSB at replication (37). Indeed, γ H2AX activation is mainly produced during DNA repair process. Nevertheless, H2AX

phosphorylation is also detected during apoptosis, as results of DNA fragmentation (38). To explore this possibility, we investigate the association of γ H2AX and caspase-3 activation in the Zalypsis action. Since this drug is a weak γ H2AX inductor at IC₅₀ doses and 1 hour of exposure (Figures 3A and 3B) and to compare to strong exposures used in recent works, HeLa-M cells were treated with 750 nM Zalypsis (corresponding to 5 times the IC₅₀) for 1, 3 or 6 hours continuously. Indeed, Zalypsis showed a significant γ H2AX labeling after 6 hours of exposure, although in a lower level when compared to the potent cytotoxic antitumoral agent SN-38 (30) (Figure 8A). On the other hand, about 63 % of the γ H2AX positive cells treated with Zalypsis showed cleaved-caspase-3 colocalization (Figure 8B). However, the same profile was not demonstrated by SN-38-treated cells which only 13 % of γ H2AX positive cells demonstrated caspase 3 activation (Figure 8B). Thus, our results show that the γ H2AX formation following Zalypsis exposure is strongly correlated with apoptosis induction.

In conclusion, Zalypsis at low doses and short treatment exposures is able to provoke DSB, replication inhibition and fast cell death involving early apoptosis signaling. However, tumor cellular responses to Zalypsis did not involve the traditional cell cycle arrest and checkpoint induced by others alkylating agents (28,30,32). In contrast, we suggest that γ H2AX induced by Zalypsis is a later response and not an early DNA damage signaling. Taken together, our data provide a better understanding of the Zalypsis cytotoxic activity which highlights its clinical use mainly toward ovarian and cervical tumors.

AUTHOR CONTRIBUTION

Miriana da S. Machado carried out all assays and wrote the manuscript. Daniele G. Soares participated in the viability and immunofluorescence studies. Alexandre Escargueil participated in the design and coordination of the study. Carlos Galmarini helped to draft the manuscript. João Antonio P. Henriques participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. Annette K. Larsen conceived the study and participated in its design and

coordination. She also helped to draft the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by CAPES/COFECUB (French-Brazilian collaborative research grant n. 583/07), PRONEX CNPq/FAPERGS (research grant n. 10/0044-3) and Pharmamar (Madrid, Spain). Miriana da S. Machado was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. Daniele G. Soares was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Villejuif, France.

REFERENCES

- 1 - Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Rev.* 2002, 2: 189-200.
- 2 - Cai X, Gray Jr PJ., Von Hoff DD. DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat. Rev.* 2009, 35:437–450.
- 3 - Baraldi PG, Bovero A, Fruttarolo F, Preti D, Tabrizi MA, Pavani MG, et al. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med. Res. Rev.* 2004, 24:475–528.
- 4 - Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol.* 2007, 18(6):497-503.
- 5 – Lorusso D, Mainenti S, Pietragalla A, Ferrandina G, Foco G, Masciullo V, et al. Brostallicin (PNU-166196), a new minor groove DNA binder: preclinical and clinical activity. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2009, 18(12):1939-46.
- 6 - Leal JF, Martínez-Díez M, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, et al. PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 161(5):1099-110.
- 7 - Vincenzi B, Napolitano A, Frezza AM, Schiavon G, Santini D, Tonini G. Wide-spectrum characterization of Trabectedin: biology, clinical activity and future perspectives. *Pharmacogenomics*, 2010, 11 (6): 865-78.
- 8 - Ganjoo KN, Patel SR. Trabectedin: an anticancer drug from the sea. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009, 10:16.
- 9 – D’Incalci M, Galmarini C. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.* 2010, 9(8):2157-63.
- 10 - Faircloth G, Cuevas C. Kahalalide F and ES285: potent anticancer agents from marine molluscs. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2006, 43: 363–379.
- 11 – Ocio EM, Maiso P, Chen X, Garayoa M, Álvarez-Fernández S, San-Segundo L, et al. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma double-strand breaks activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA. *Blood* 2009, 113(16): 3781-91.
- 12 – Leal JF, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, Negri A, et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis in several human cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 2009, 78:162–170.
- 13 – Colado E, Paino T, Maiso P, Ocio EM, Chen X, Alvarez-Fernandez S, et al. Zalypsis displays preclinical activity in acute myeloid blasts and leukemic

progenitor cells through the induction of a DNA damage response. *Haematologica* 2011.

14 – Moore BM, Seaman FC, Hurley LH. NMR-based model of an Ecteinascidin 743-DNA adduct. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119:5475-76.

15 - Guirouilh-Barbat J, Antony S, Pommier Y. Zalypsis (PM00104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2009, 8(7):2007-14.

16 - Boyum A. *Lymphology* 1977, 10:71–76.

17 - Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Comisso M, Waters SJ, Larsen AK. Marked activity of irifulven toward human carcinoma cells: comparison with cisplatin and ecteinascidin. *Clin Cancer Res* 2003, 9:2817-25.

18 - Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35(3):206-21.

19 - Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protocols* 2006, 1:23–29.

20 - Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, Raymond E, Bonatto D, et al. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:13062-7.

21 – Machado MS, Villela IV, Moura DJ, Rosa RM, Salvador M, Lopes NP, et al. 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: a new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mutat Res.* 2009, 673(2):133-40.

22 - Koeppel F, Poindessous V, Lazar V, Raymond E, Sarasin A, Larsen AK. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10:5604–5613.

23 - Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010, 24(4):679-86.

24 - Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5(2):102-12.

25 - Rocca CJ, Poindessous V, Soares DG, Ouadrani KE, Sarasin A, Guérin E, et al. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *Biochem Pharmacol.* 2010, 80(3):335-43.

26 - Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105:2415–20.

- 27 - David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Rosu F, Colson P, de Pauw E, et al. Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism. *Mol. Cancer Ther.* 2005, 4:71–80.
- 28 - Soares DG, Battistella A, Rocca CJ, Matuo R, Henriques JA, Larsen AK, et al. Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase drives both the early and the late DNA damage response to the monofunctional antitumor alkylator S23906. *Biochem. J.* 2011.
- 29 - Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995, 376:37–43.
- 30 - Haug K, Kravik KL, de Angelis PM. Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res.* 2008, 28: 583-592.
- 31 - Lenglet G, David-Cordonnier MH. DNA-destabilizing agents as an alternative approach for targeting DNA: mechanisms of action and cellular consequences. *J. Nucleic Acids.* 2010, 2010.
- 32 - Mladenov, E., Tsaneva, I., Anachkova, B. Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin. *C J. Cell. Physiol.* 2007, 211: 468–476.
- 33 - Hlavín EM, Smeaton MB, Miller PS. Initiation of DNA Interstrand Cross-link Repair in Mammalian Cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2010, 51:604-624.
- 34 – Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9:297-308.
- 35 - Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2008, 8(12):957-67
- 36 - Xu Y, Price BD. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 2011, 10(2):261-7.
- 37 - Banath JP, Klovov D, MacPhail SH, Banuelos AC, Olive PL. Residual gH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer* 2010, 10:4.
- 38 - Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:9390-9395.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures. (A), Trabectedin (ET-743, Yondelis®), (B), Zalypsis® (PM00104).

Figure 2. Cytotoxic activities of Zalypsis toward different cell lines. Normal and tumor cell lines were exposed to Zalypsis for 1 h followed by post-incubation in drug-free media for 4 doubling times and was analyzed by MTT viability assay. The histograms represent the IC₅₀ values of three independent experiments, each done in duplicate. Bars, standard deviation.

Figure 3. DNA strand breaks induction by Zalypsis in different cell lines. Cells were exposed to Zalypsis for 1 hour and processed for the comet assay or immunofluorescence. (A) V79B cells analyzed by the neutral comet assay; (B) γ H2AX labeling in IGROv1 cells; (C) nonproliferating lymphocytes analyzed by alkaline comet assay; (D) γ H2AX labeling in nonproliferating lymphocytes. At least 200 cells were analyzed by sample and the values represent the averages of at least two independent experiments. Neutral and alkaline comet assay were performed immediately after the treatments. For immunofluorescence analyzes, after indicated treatments, cells were fixed in paraformaldehyde and processed for immunolabeling. For each time point, the fluorescence intensities were quantified by Metamorph software. At least 200 cells were analyzed per point. Values represent the average of at least two independent experiments.

Figure 4. DNA synthesis inhibition induced by Zalypsis in IGROv1 cells. Replicating cells were labeled by incorporation of EdU (Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488) for 30 minutes prior to drug addition. Then, IGROv1 cells were exposed to indicated doses of Zalypsis for 1 hour. At least 200 cells were analyzed by sample and the values represent the averages of at least two independent experiments. Standard deviations are indicated by error bars when they exceed symbol size.

Figure 5. Cell cycle analyzes in tumor cells exposed to Zalypsis. (A) Hela-M or (B) IGROv1 cells were exposed to IC₅₀ doses of Zalypsis for 1 hour followed by 6, 14, 24 and 48 hours of post-incubation in drug-free medium.

Then, cells were processed for flow cytometry analysis. Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

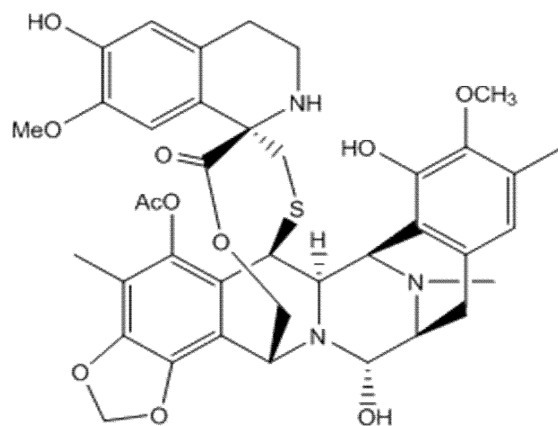
Figure 6. Zalypsis did not induce cell cycle arrest. IGROv1 cell cycle histograms of **(A)** untreated or **(B)** 150 nM Zalypsis and **(C)** 2 μ M S23906 treated cells were analyzed after 6 hours of incubation in drug-free medium.

Figure 7. Cell death induced by Zalypsis. HeLa-M cells were exposed to 150 nM Zalypsis for 1 hour followed by 3 and/or 6, 14, 24 and 48 hours in drug-free medium and the **(A)** increase of sub-G1 cells or **(B)** cleaved-caspase-3 positive cells were analyzed by flow cytometry. Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

Figure 8. Zalypsis induces γ H2AX and cleaved-caspase-3 colocalization. HeLa-M cells were exposed to 750 nM Zalypsis for 1, 3 or 6 hours. Then, cells were processed and analyzed for **(A)** γ H2AX labelling; and **(B)** γ H2AX and cleaved-caspase 3 colocalization. Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

FIGURE 1

A



B

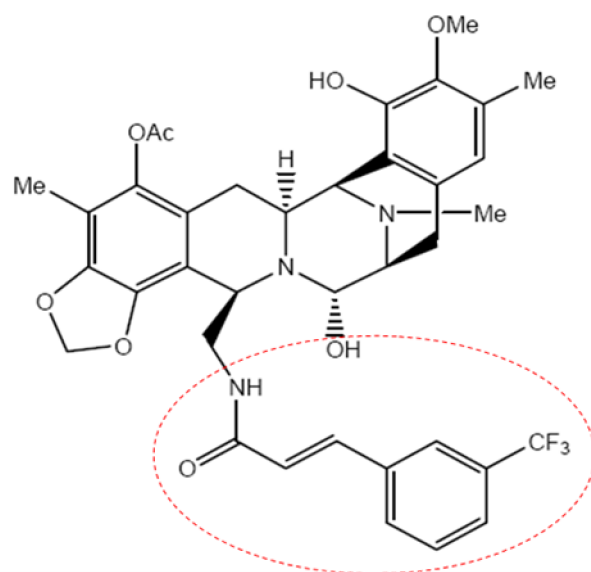


FIGURE 2

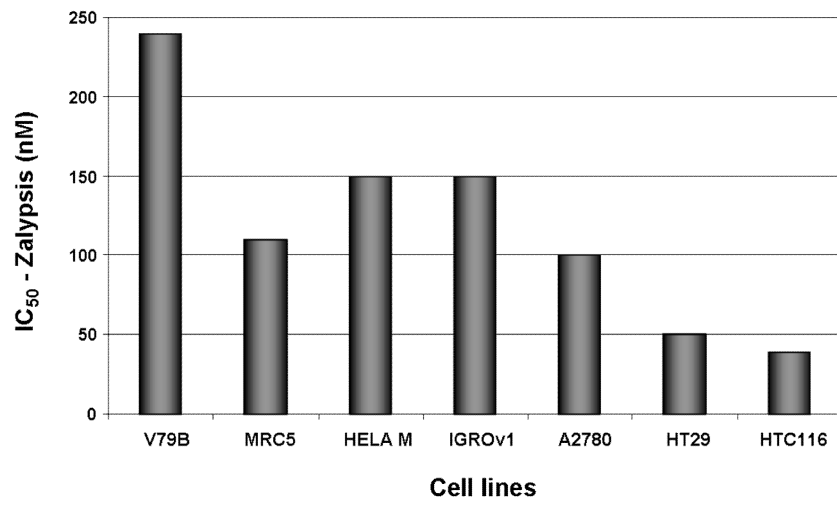
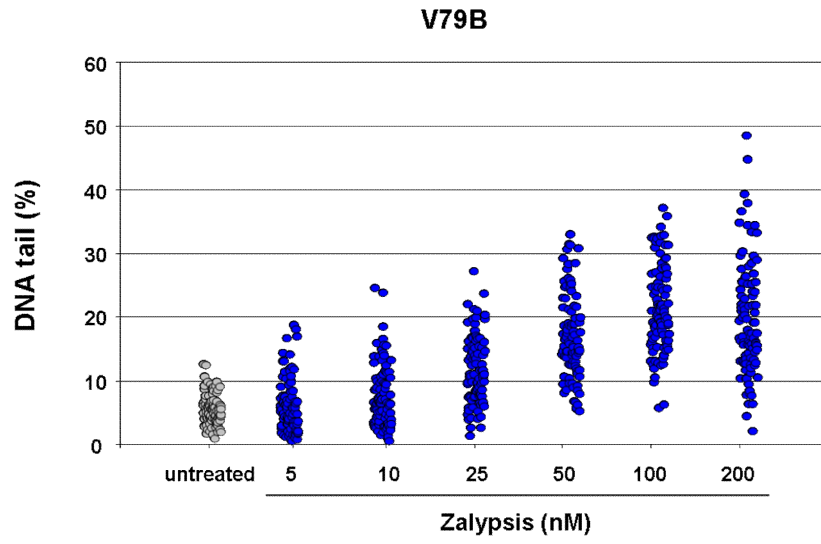


FIGURE 3

A



B

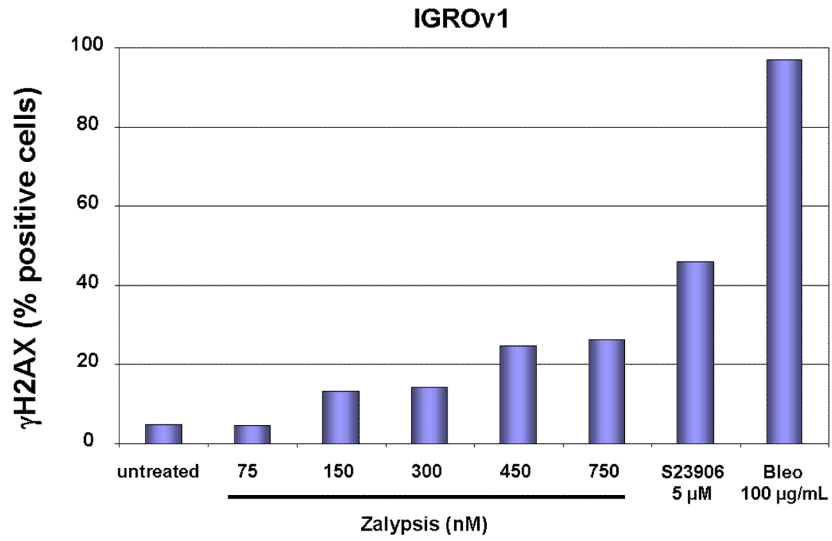
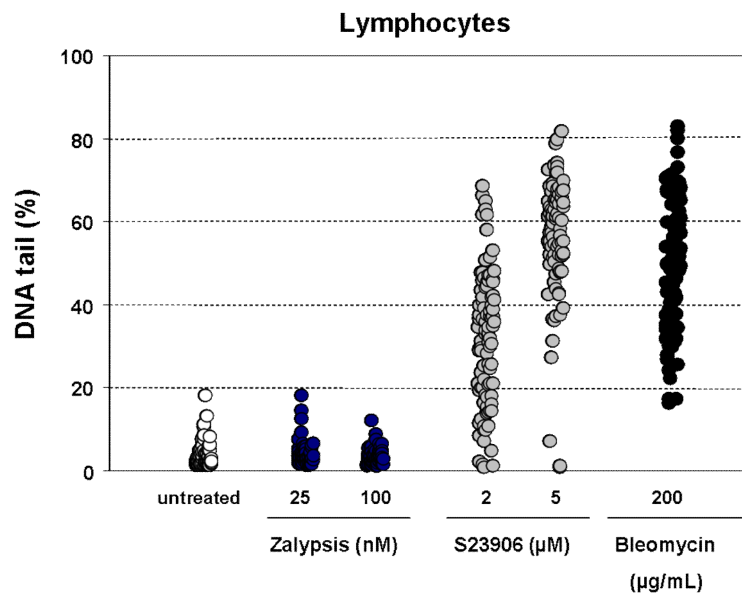


FIGURE 3

C



D

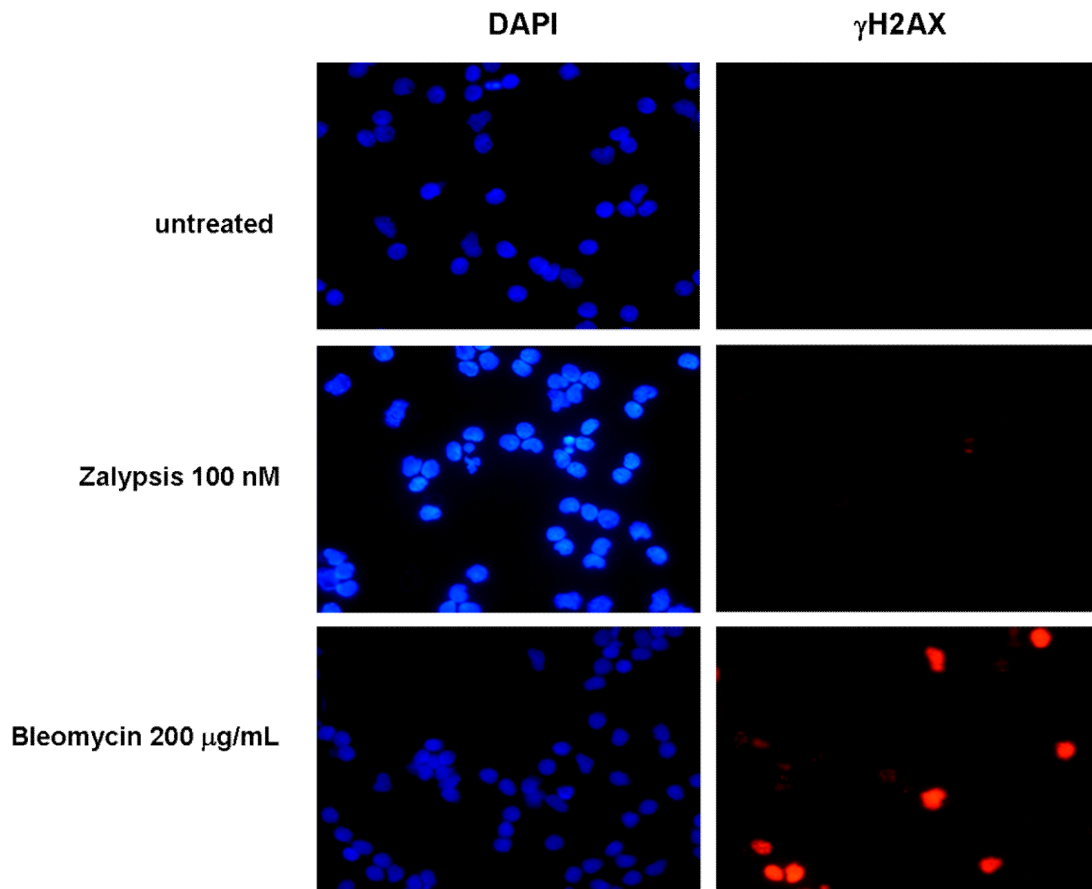


FIGURE 4

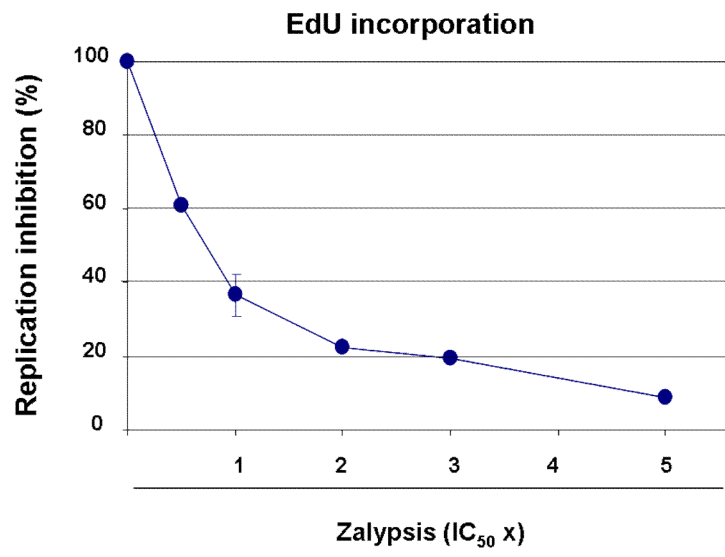


FIGURE 5

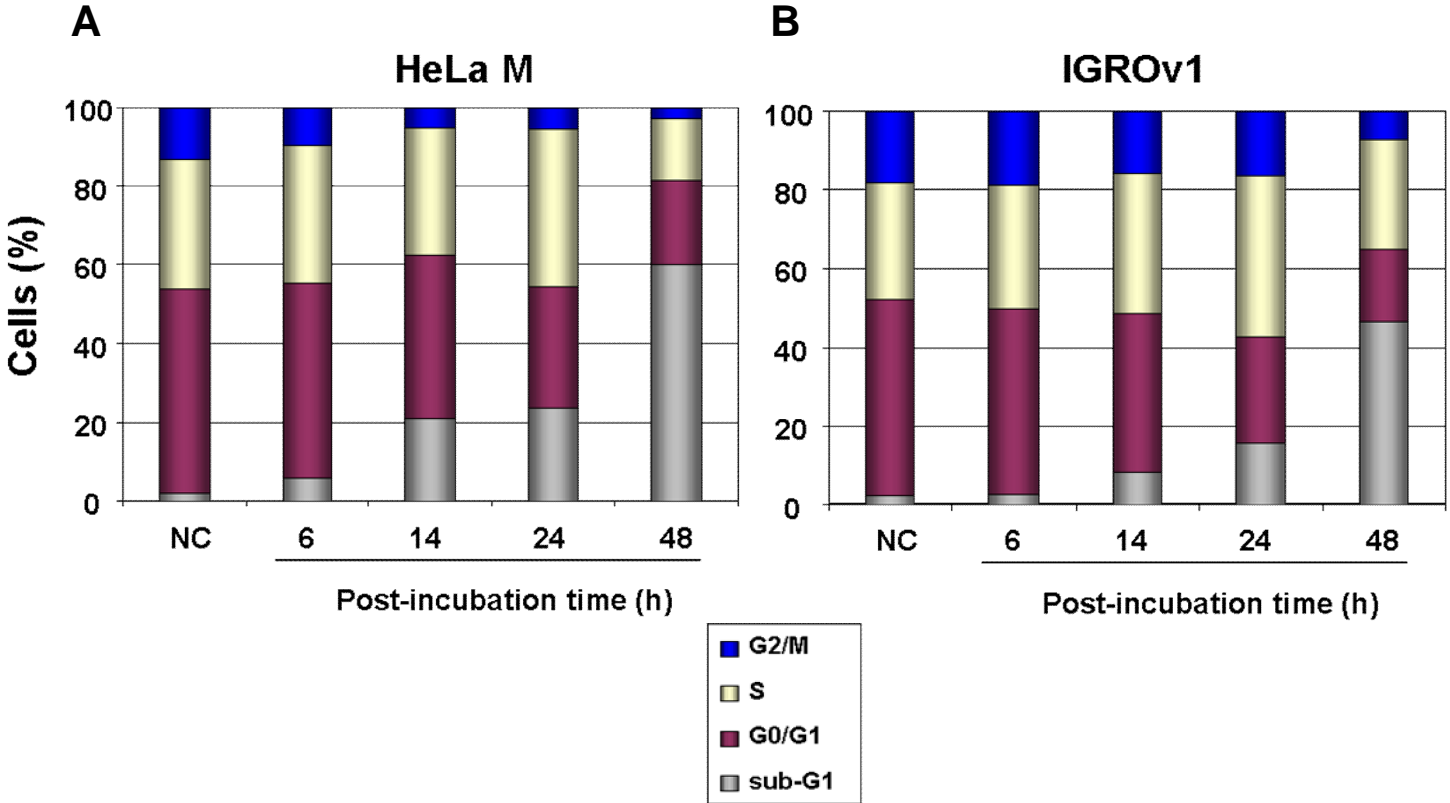


FIGURE 6

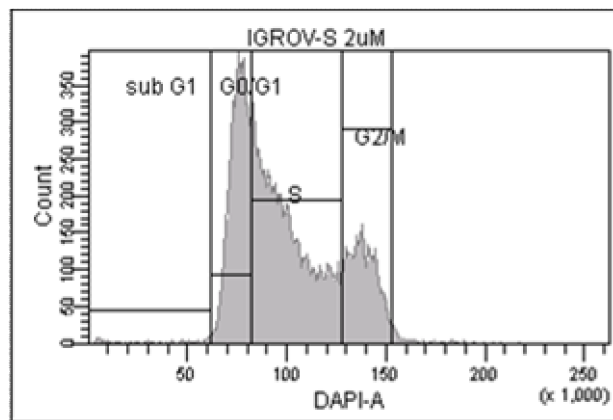
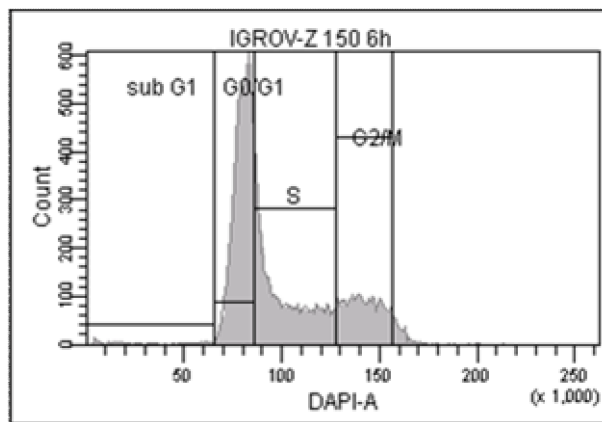
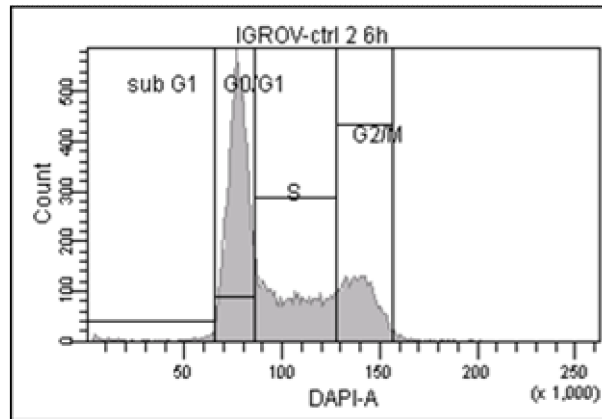
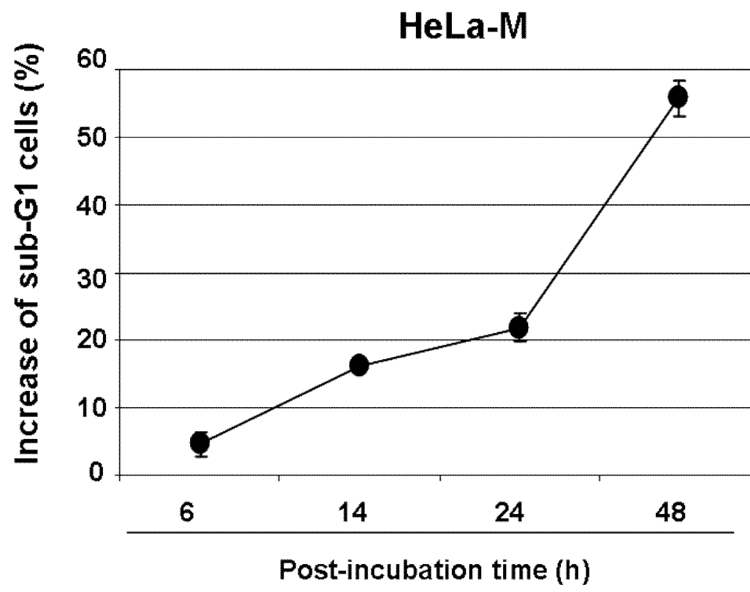


FIGURE 7

A



B

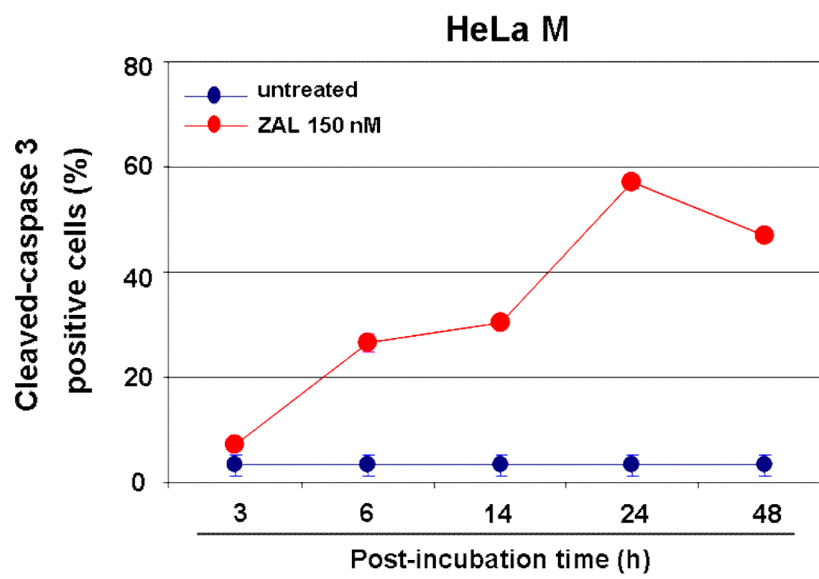
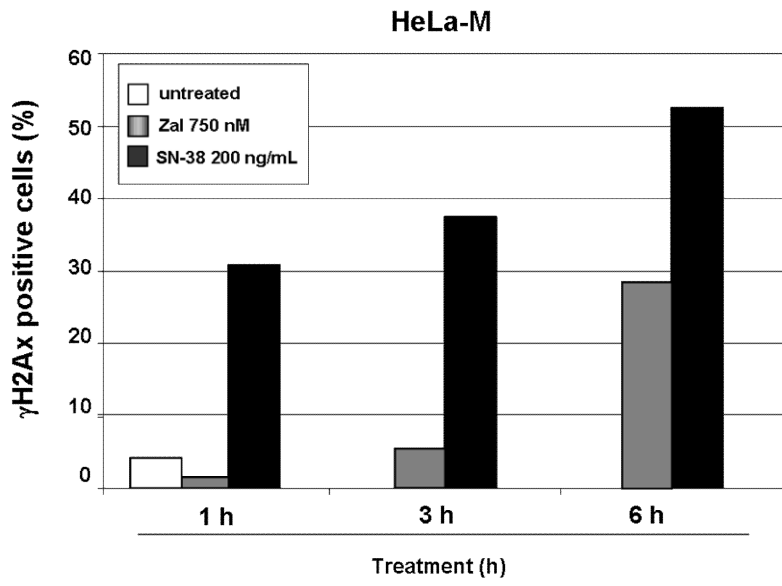
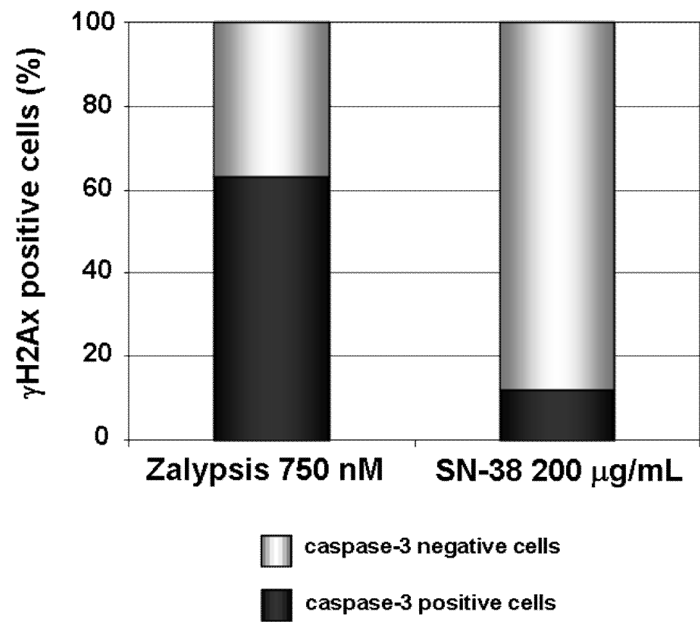


FIGURE 8

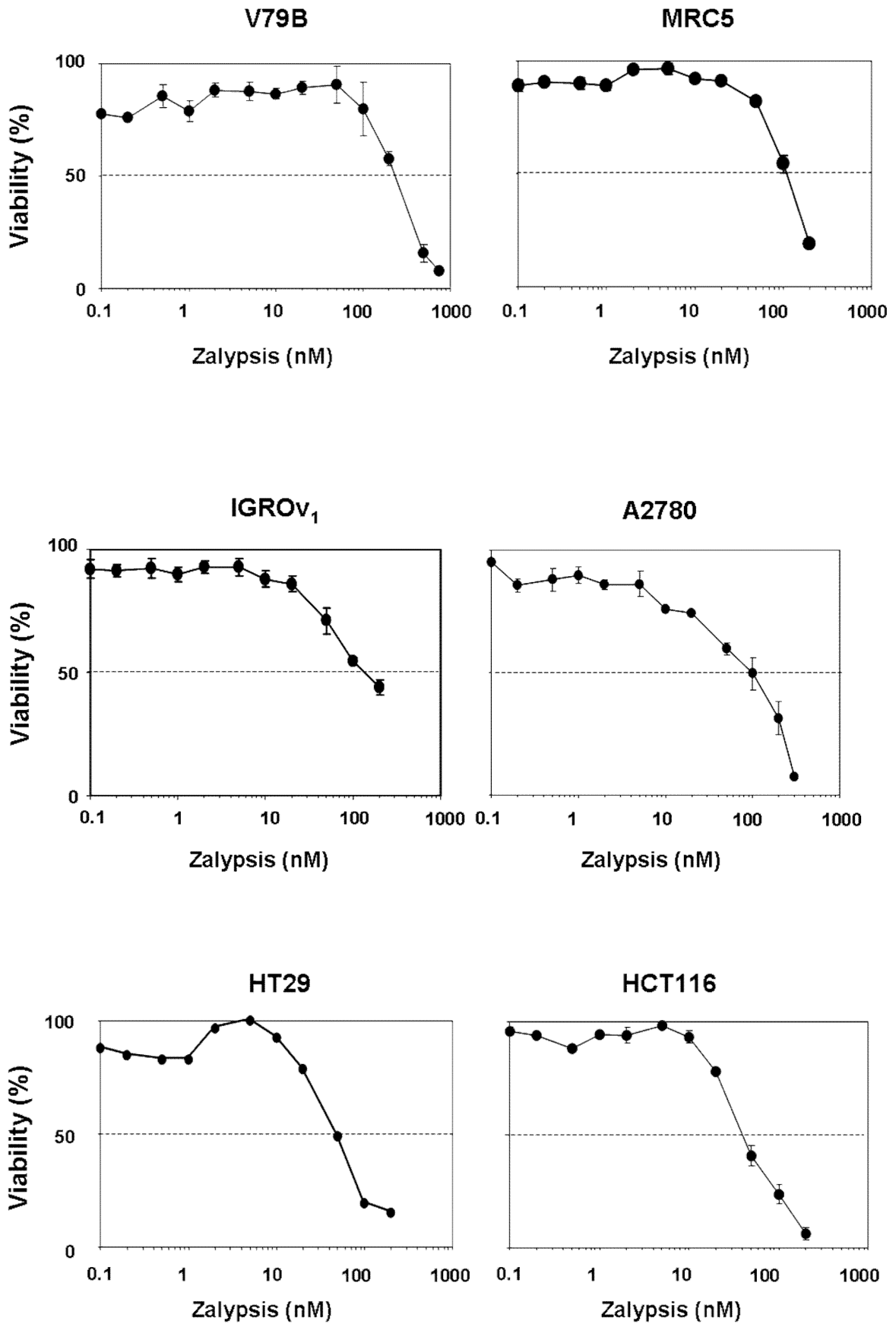
A



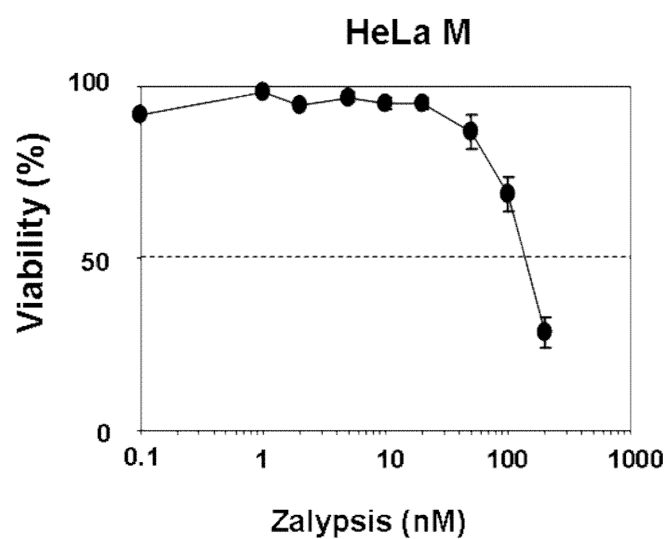
B



Supplementary Figure S1

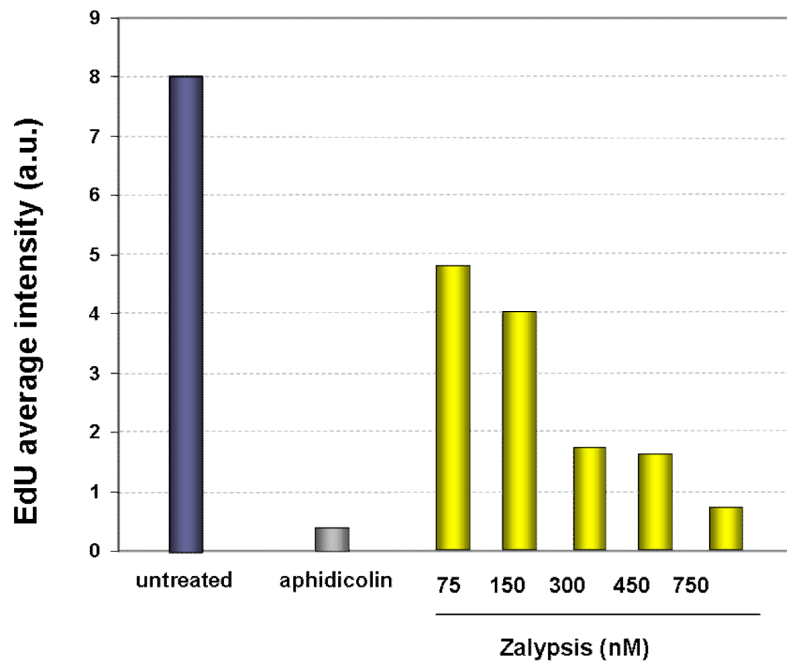


Supplementary Figure S1



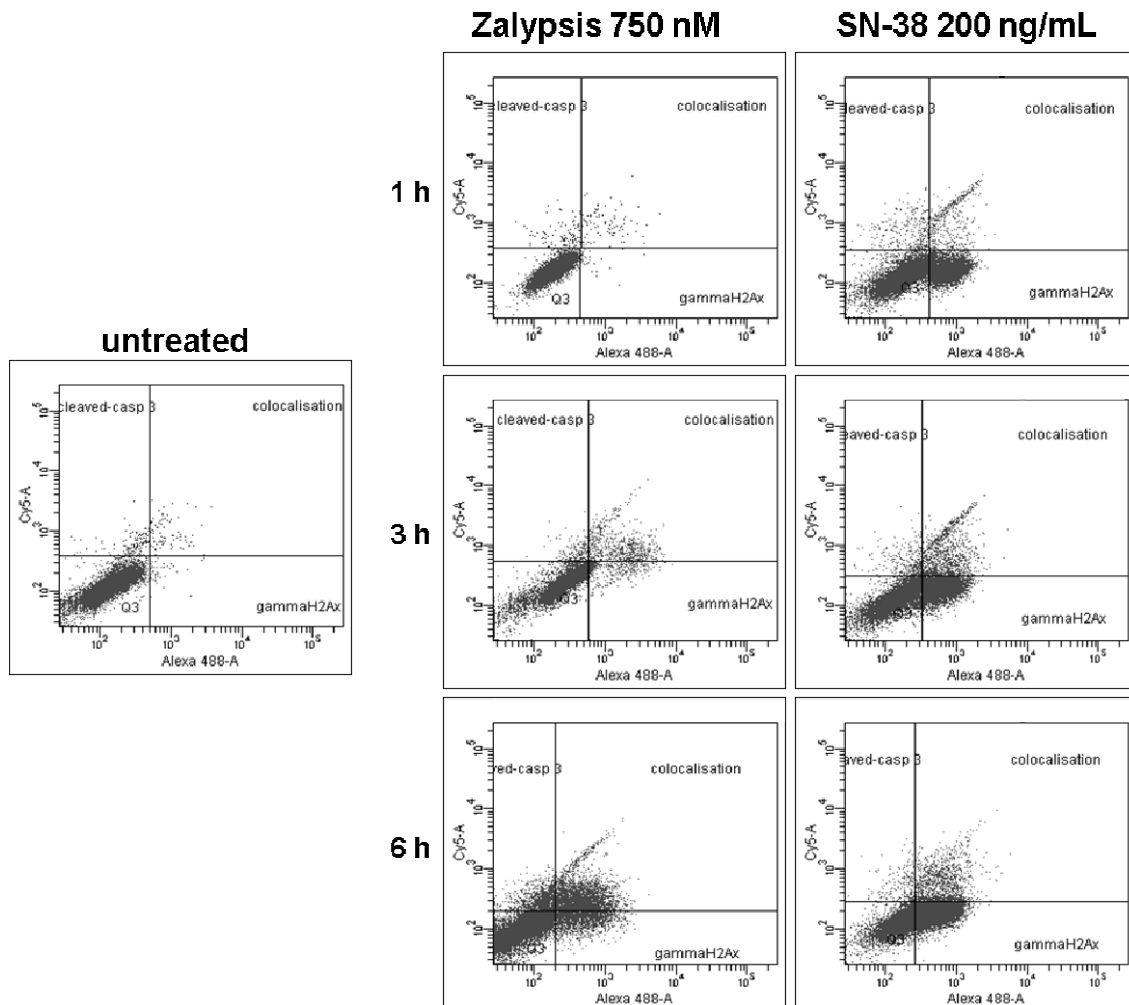
Supplementary Figure S1. Cytotoxic activities Zalypsis toward different cell lines. Normal or tumor cell lines were exposed to Zalypsis for 1 h. The viability was determined by the MTT assay after four generation times. All curves represent an average of at least three independent experiments, each done in duplicate. Error bars represent standard errors and are indicated when they exceed symbol size.

Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2. DNA synthesis inhibition induced by Zalyopsis in IGROv1 cells. Replicating cells were labeled by incorporation of EdU (Click-iTTM EdU Alexa Fluor® 488) for 30 minutes prior to drug addition. Then, IGROv1 cells exposed to indicated doses of Zalyopsis for 1 hour. Fluorescence intensities were measured by using MetaMorph software. At least 100 cells were analyzed by sample and the values represent the averages of at least two independent experiments.

Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3. Zalypsis induces γ H2AX and cleaved-caspase-3 colocalization. HeLa-M cells were exposed to 750 nM Zalypsis for 1, 3 or 6 hours. Then, cells were washed, fixed and incubated with indicated antibodies. After, cells were washed in PBS and incubated for 30 minutes at room temperature in 100 μ g/mL RNase and 5 μ g/mL DAPI. Samples were analyzed with a LSR II flow cytometer and DIVA software. (A) γ H2AX labelling; (B) γ H2AX and cleaved-caspase 3 colocalization. Values are given as the mean of at least two independent experiments, each done in duplicate.

CAPÍTULO II

**TRABECTEDIN AND ITS C-SUBUNIT MODIFIED ANALOGUE
PM01183 ATTENUATE NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR AND
SHOW ACTIVITY TOWARD PLATINUM-RESISTANT CELLS**

Artigo aceito para publicação na revista *Molecular Cancer Therapeutics*.

No presente Capítulo, será ilustrado o artigo elaborado sobre os mecanismos de ação do agente alquilante antitumoral Tryptamicidin em linhagens celulares sensíveis ou resistentes à cisplatina, principalmente em relação ao envolvimento do sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER). Este artigo foi recentemente aceito para publicação no periódico *Molecular Cancer Therapeutics*. Neste trabalho, demonstrou-se que as lesões no DNA induzidas pelo Tryptamicidin não são reparadas pelo NER. No entanto, assim como o seu análogo trabectedina, o Tryptamicidin é capaz de atenuar a atividade do NER no processamento de lesões induzidas pela radiação ultravioleta, as quais são substratos clássicos para esta via de reparação. Além disso, o Tryptamicidin mostrou efeito citotóxico aditivo ou sinérgico quando utilizado em associação com a cisplatina em linhagens sensíveis ou resistentes a este agente platinado. Estas observações reforçam as atividades antitumorais do Tryptamicidin e sugerem uma possível aplicação clínica no tratamento de tumores em combinação com a cisplatina.



Molecular Cancer Therapeutics

Trabectedin and Its C Subunit Modified Analogue PM01183 Attenuate Nucleotide Excision Repair and Show Activity toward Platinum-Resistant Cells

Daniele G. Soares, Miriana S. Machado, Céline J. Rocca, et al.

Mol Cancer Ther Published OnlineFirst May 27, 2011.

Updated Version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0252
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://mct.aacrjournals.org/content/suppl/2011/06/30/1535-7163.MCT-11-0252.DC1.html

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
----------------------	--

Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
-----------------------------------	--

Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .
--------------------	---

Trabectedin and Its C Subunit Modified Analogue PM01183 Attenuate Nucleotide Excision Repair and Show Activity toward Platinum-Resistant Cells

Daniele G. Soares^{1,2}, Miriana S. Machado^{1,2,4}, Céline J. Rocca^{1,2}, Virginie Poindessous^{1,2}, Djamila Ouaret^{1,2}, Alain Sarasin³, Carlos M. Galmarini⁶, João A. P. Henriques^{4,5}, Alexandre E. Escargueil^{1,2}, and Annette K. Larsen^{1,2}

Abstract

PM01183 is a novel marine-derived covalent DNA binder in clinical development. PM01183 is structurally similar to trabectedin (yondelis, ecteinascidin-743) except for the C subunit, and this modification is accompanied by different pharmacokinetics in cancer patients. We here characterize the interaction of PM01183 with the nucleotide excision repair (NER) pathway in comparison with trabectedin. Our results show for the first time that although neither PM01183 nor trabectedin is repaired by NER, both compounds are able to interfere with the NER machinery thereby attenuating the repair of specific NER substrates. We further show that the NER activity is increased in 3 of 4 cellular models with acquired resistance to cisplatin or oxaliplatin, confirming the involvement of NER in the resistance to platinum derivatives. Importantly, both PM01183 and trabectedin show unchanged or even enhanced activity toward all 4 cisplatin- and oxaliplatin-resistant cell lines. We finally show that combinations of PM01183 and cisplatin were mostly synergistic toward both parental and cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells as indicated by Chou and Talalay analysis. These data show that the C subunit of trabectedin can be subjected to at least some structural modifications without loss of activity or NER interaction. While PM01183 and trabectedin appear functionally similar in cellular models, it is likely that the differences in pharmacokinetics may allow different dosing and scheduling of PM01183 in the clinic that could lead to novel and/or increased antitumor activity. Taken together, our results provide a mechanistic basis to support clinical trials of PM01183 alone or in combination with cisplatin. *Mol Cancer Ther*; 10(8); 1–9. ©2011 AACR.

Introduction

PM01183 is a novel marine-derived ecteinascidin derivative in clinical development (1). It is a covalent DNA minor groove binder and is structurally similar to trabectedin (yondelis, ecteinascidin-743) except for the C subunit, where the tetrahydroisoquinoline present in trabectedin is replaced by a tetrahydro β -carboline in PM01183 (2) as outlined in Fig. 1A. This structural

variation is accompanied by important modifications of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in cancer patients (1).

Trabectedin has an unusual interaction with the nucleotide excision repair (NER) machinery, which distinguishes it from other covalent DNA binders. It is currently unclear if the same will be the case for PM01183 considering that the interaction of the C subunit with NER proteins is controversial. In particular, one study indicated that the C subunit was essential for interaction with NER proteins (3), whereas another study reported that the C subunit had no influence (4).

NER-deficient mammalian cells show at least 2-fold resistance to trabectedin (5, 6) in clear contrast to what is observed for other covalent DNA binding agents where NER deficiency is accompanied by increased sensitivity (7–9). Elegant studies in yeast indicate that the trabectedin-DNA adducts interact with the Rad13 endonuclease, the fission yeast orthologue of the NER endonuclease XPG (10). This finding suggests that trabectedin exposure is accompanied by the accumulation of ternary DNA-trabectedin-endonuclease complexes on the DNA (5, 6, 11), which upon collision with the replication fork leads to formation of DNA double-strand breaks (DSB). In agreement, we have previously shown that the levels

Authors' Affiliations: ¹Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938; ²Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris; ³Centre National de la Recherche Scientifique UMR8200, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; ⁴Department of Biophysics/Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; ⁵Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil; and ⁶Cell Biology Department, PharmaMar, Madrid, Spain

Note: Supplementary material for this article is available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Dr. Annette K. Larsen, Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 Rue Faubourg Saint-Antoine, Paris 75571, France. Phone: 33-1-49-284612; Fax: 33-1-42-226429; E-mail: annette.larsen@upmc.fr

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0252

©2011 American Association for Cancer Research.

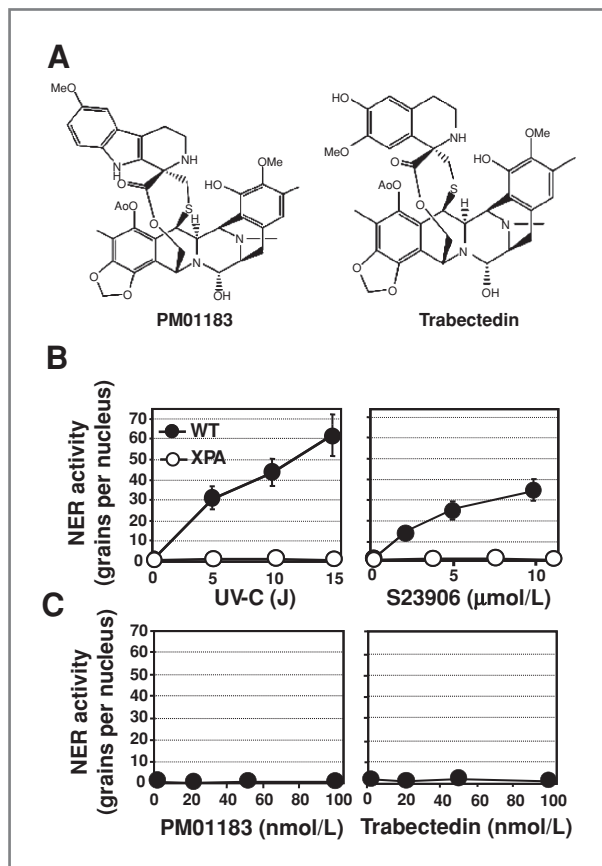


Figure 1. NER of PM01183 and trabectedin. A, chemical structures of PM01183 and trabectedin. B, UDS in NER-proficient AS198 and XPA-deficient AS162 cells was determined after exposure to UV-C radiation (254 nm) at the indicated doses (left) or to S23906 for 1 hour (right). C, NER-proficient AS198 cells were treated with PM01183 or trabectedin for 1 hour and the UDS determined. All values are averages for at least 30 individual nuclei from 2 independent experiments. SDs are indicated by error bars when they exceed symbol size.

of trabectedin-induced DSBs are less for XPG-deficient than for XPG-proficient human cells (12). By extension, one could speculate that cells with increased NER activity might show increased sensitivity to trabectedin. However, this issue has, to the best of our knowledge, not been addressed so far.

NER is one of our most versatile repair pathways in terms of lesion recognition and influences the response to many DNA-binding anticancer agents (13). In particular, NER is considered as a key pathway for platinum compounds, a widely used class of anticancer agents (14) and acquired resistance to platinum-based therapies has classically been associated with increased NER activity (14–16). Therefore, an attractive strategy for second-line treatment would be to treat patients with relapsed tumors previously exposed to platinum regimens with drugs that are not subject to NER repair (17). Based on the results of the phase III OVA301 study (18), trabectedin was approved by the European Union in 2009 for treatment of patients with relapsed platinum-sensitive ovar-

ian cancer in combination with pegylated liposomal doxorubicin.

More recently, the relative contribution of NER to platinum resistance has been reassessed. The determination of NER activity in tissues from cancer patients is typically based on the expression of the ERCC1 endonuclease, the last step in the NER pathway. However, the demonstration that ERCC1 also contributes to other types of DNA repair including recombination repair (19–23), the lack of a straight-forward relationship between ERCC1 protein levels and NER activity in cellular models (9, 24) as well as technical issues (25) raise the question to which degree acquired platinum resistance is accompanied by upregulation of NER activity.

We here characterize the repair of PM01183 and trabectedin adducts in living cells. Our results show for the first time that although neither compound is repaired by NER, both are able to interfere with the NER machinery thereby attenuating the repair of specific NER substrates. We further show that the NER activity is increased in 3 of 4 cellular models with acquired resistance to cisplatin or oxaliplatin confirming the involvement of NER in the resistance to platinum derivatives. Importantly, trabectedin and PM01183 show either unchanged or enhanced activity toward the cisplatin- or oxaliplatin-resistant cell lines coherent with previous findings for trabectedin in NER-deficient mutants. The data show that the C subunit can be subjected to at least some structural modifications without loss of the NER interaction. Taken together, our results provide a mechanistic basis to support clinical trials of PM01183 alone or in combination with cisplatin.

Materials and Methods

Drugs and cell lines

PM01183, trabectedin and biotinylated trabectedin (PM01118) were provided by PharmaMar. The acronycine derivative S23906 was obtained from Institut de Recherches Servier, whereas cisplatin was purchased from Merck Génériques. Oxaliplatin (Eloxatin) was obtained from Sanofi-Aventis. NER-proficient (198VI/AS198) and XPA-deficient (XP162VI/AS162) primary fibroblasts were derived from unexposed skin biopsies of a control individual and a patient with *Xeroderma pigmentosum* complementation group A, respectively, in the laboratory of Alain Sarasin. HT-29 colon carcinoma cells were obtained from Richard Camalier (National Cancer Institute), whereas the HCT-116 colon carcinoma cells were a gift from Bert Vogelstein. Oxaliplatin-resistant HT-29 (HT-29/oxa) and HCT-116 (HCT-116/oxa) cells were developed in the laboratory of Annette K. Larsen. Parental A2780 and cisplatin-resistant A2780/CP70 ovarian carcinoma cells were kindly provided by Robert Brown, whereas parental IGROV1 and cisplatin-resistant IGROV1/CDDP ovarian carcinoma cells were provided by Alain Pierré. The cells were maintained in MEM (AS198, AS162), McCoy's 5A (HCT-116,

HCT-116/oxa), RPMI 1640 (IGROV1, IGROV1/CDDP), or Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; HT-29, HT-29/oxa) supplemented with 5% fetal calf serum (PAA), 2 mmol/L L-glutamine (PAA), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (PanPharma). All cell lines were regularly tested for *Mycoplasma* contamination using the Mycoplasma Detection Kit Myco Alert (# LT07-318).

Unscheduled DNA synthesis

DNA repair synthesis associated with NER was measured as described previously (9, 26). Briefly, cells were seeded on glass coverslips and grown for 24 hours. The concentration of fetal calf serum was reduced to 0.5% in the presence of 1 µmol/L fluorodeoxyuridine. The following day, the cells were exposed for 1 hour to PM01183, trabectedin, or S23906 or irradiated with the indicated doses of UV light (254 nm). The cells were then labeled with [³H]thymidine (10 µCi/mL) for 3 hours, postincubated with cold thymidine for 1 hour, and subjected to autoradiography. After 1 week, the number of grains per nucleus was determined. At least 30 nuclei per sample were analyzed for primary cells and at least 100 nuclei for transformed cells. To determine the influence of PM01183 or trabectedin on the repair of UV-induced lesions, cells were preincubated for 1 hour at 37°C with 1 of the 2 drugs before irradiation. The cells were then analyzed as described above.

Immunofluorescence and microscopy

Immunofluorescence labeling was carried out as previously described (27). When indicated, cells were washed twice in PBS, resuspended in cold CSK-lysis buffer (150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1% Triton ×100, 50 mmol/L HEPES pH 7.4, and 30 mmol/L sucrose and protease inhibitors) and kept at 4°C for 5 minutes before fixation in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences). The cells were then permeabilized with PBS-Triton (0.5%) for 20 minutes. Coverslips were saturated in PBS+ (PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.2% gelatin) and antigens were revealed by using an anti-6-4 photoproduct (PP) antibody (clone 64M-2, Cosmo Bio Co). The secondary antibody used was a Cy3-conjugated donkey antimouse IgG (# 715-165-150, Jackson ImmunoResearch). Detection of biotinylated trabectedin was conducted with a Tyramide Signal Amplification Kit (TSA #22 with HRP-streptavidin and Alexa Fluor 488 tyramide T-20932, life Tech). Images were collected using a B×61 microscope and cell F imaging software (Olympus). Fluorescence intensities were measured using MetaMorph software (Universal Imaging Corporation). The background over noncellular regions was subtracted. At least 200 cells were analyzed per sample. The indicated values represent the average of at least 2 independent experiments. The corresponding experiment was not carried out for PM01183 because the biotinylated form of PM01183 has not been synthesized.

Viability assays

Cellular viability was determined by the MTT assay as described previously (28). Cells were exposed to PM01183, trabectedin or S23906 for 1 hour and postincubated in drug-free media for 4 to 5 doubling times. Alternatively, the cells were exposed to cisplatin or oxaliplatin throughout the entire incubation period. All values are averages of at least 3 independent experiments each done in duplicate. The combination studies were carried out by simultaneous exposure of the cells to increasing concentrations PM01183 and fixed concentrations of cisplatin (IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, and IC₅₀ values) as described previously (29). Similar experiments were carried out with fixed concentrations of PM01183 and increasing concentrations of cisplatin.

Statistical analysis

Drug combination effects were determined using the Chou and Talalay method based on the median-effect equation (30), and are indicated in terms of combination index (CI). CI values of less than 0.8 indicate synergy, values between 0.8 and 1.2 indicate additive effects, and values more than 1.2 indicate antagonism. Data were analyzed using the concentration effect analysis software (Biosoft). Statistical analysis and graphs were accomplished by GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software).

Results

PM01183 and trabectedin-induced DNA lesions are not repaired by NER

Previous studies with NER-deficient cells indicate that trabectedin adducts are not repaired by NER (5, 6). For direct confirmation, we used the unscheduled DNA synthesis (UDS) assay, which measures DNA repair synthesis, the last step of the NER pathway, in living cells. Exposure of human fibroblasts to UV irradiation (Fig. 1B left) or to S23906, another covalent DNA minor groove binder with similar binding specificity as the ecteinascidins (31, 32; Fig. 1B right), was accompanied by a dose-dependent increase in UDS that was NER specific because no influence on UDS was observed for the NER-deficient XPA cells. In clear contrast, no UDS was observed for cells exposed to PM01183 or trabectedin, whatever the dose (Fig. 1C).

Chromatin-associated trabectedin is slowly removed

To characterize DNA repair in proliferating cells we used biotinylated trabectedin, which enabled us to follow the removal of the ecteinascidin adducts. Proliferating cells were exposed to biotinylated trabectedin for 1 hour followed by postincubation in drug-free medium for various times. The results show that trabectedin exposure leads to the formation of biotinylated nuclear foci, which persists throughout the 4-hour wash-out period (Fig. 2A). Image analysis of the labeling intensity showed no

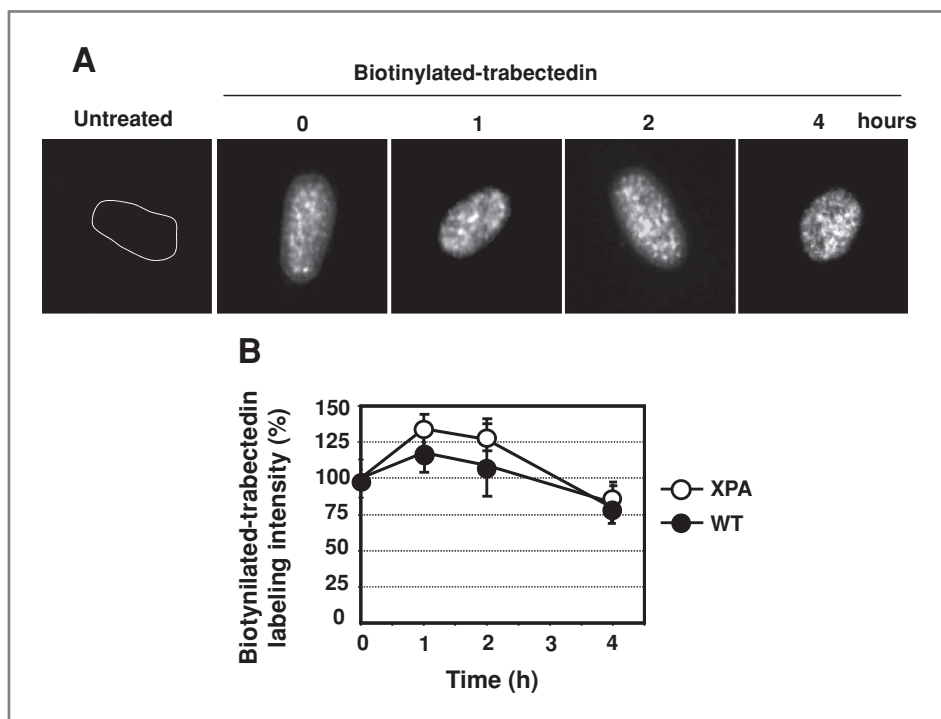


Figure 2. Removal of biotinylated trabectedin in living human cells. NER-proficient and XPA-deficient primary fibroblasts were exposed to 100 nmol/L of biotinylated trabectedin for 1 hour. The drug was removed at time 0 and cells were postincubated in drug-free media for 1, 2, and 4 hours. A, at the indicated times of postincubation, cells were resuspended in cold CSK-lysis buffer, fixed in paraformaldehyde, and processed for fluorescence microscopy. B, for each time point, the fluorescence intensities were quantified by the MetaMorph software. A minimum of 200 cells were analyzed per point. Values represent the average of at least 2 independent experiments. SDs are indicated by error bars when they exceed symbol size.

significant differences between NER-proficient and -deficient cells (Fig. 2B), confirming the incapacity of the NER process to remove the ecteinascidin adducts. The decrease in DNA-associated ecteinascidin adducts observed for both NER-proficient and -deficient cells after 4-hour wash-out is most likely because of homologous recombination repair (12).

PM01183 and trabectedin interferes with the repair of UV-induced DNA lesions

The results presented in Figs. 1 and 2 indicate that (i) either the PM01183- and trabectedin-induced DNA lesions are not recognized by the NER machinery, or (ii) that the lesions are initially recognized by the NER machinery but that the NER process is arrested at one of the subsequent steps as previously suggested (5, 6, 11, 12). If the adducts induced by PM01183 and trabectedin are recognized by the NER machinery, we would expect them to be able to compete with other NER substrates. Therefore, NER-proficient cells were exposed to different doses of UV radiation in the absence or presence of PM01183 or trabectedin and the NER activity was measured by UDS. The results show that both compounds are able to slow down the repair of UV adducts in a dose-dependent manner (Fig. 3A and B). At 15 J/m², the UDS activity in cells pretreated with PM01183 or trabectedin was significantly different ($P < 0.001$) from the UDS in control cells as determined by Student's *t* test.

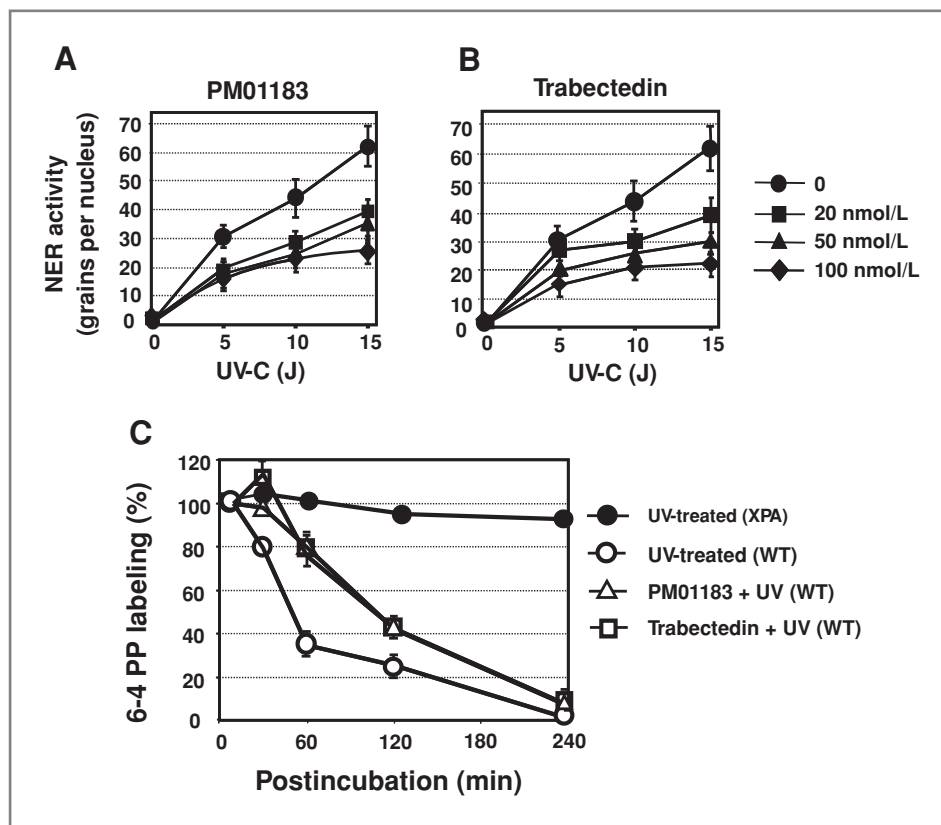
For further confirmation, we determined the influence of PM01183 and trabectedin on a different step of the NER pathway, the excision of the UV adducts. For this we used specific antibodies directed against UV-induced 6-4 PPs.

Proliferating cells were preincubated in the absence or presence of PM01183 and trabectedin (100 nmol/L) for 1 hour followed by UV irradiation at 40 J/m² and postincubation for the indicated times. The 6-4 PP lesions were efficiently repaired and could no longer be detected in repair-proficient cells 4 hours after UV irradiation (Fig. 3C, open circles) as classically found, whereas the levels of 6-4 PPs remained elevated for the XPA-mutant cells (Fig. 4C, black circles). Although the 6-4 PPs were still repaired by 4 hours in the presence of PM01183 and trabectedin (100 nmol/L), the initial repair process was slower (Fig. 3C, open triangles and open squares) with a half-life of 48 minutes in the absence of PM01183 or trabectedin and 110 minutes in their presence. Both PM01183 and trabectedin adducts modify the local structure of DNA (2, 33), which could possibly influence the formation of UV adducts. Therefore, cellular levels of 6-4 PP adducts were compared immediately after UV irradiation for the different treatment conditions. The results show that 6-4 PP formation corresponded to 14.5 ± 3.9 (arbitrary units) for the vehicle control, 13.8 ± 5.2 for the cells pretreated with trabectedin, and 14.8 ± 4.5 for the cells pretreated with PM. Therefore, preincubation with trabectedin or PM01183 had no detectable influence on the formation of UV-induced 6-4 PP adducts.

NER activity in cells with acquired platinum resistance

To establish if acquired resistance to cisplatin and oxaliplatin was accompanied by increased NER activity, we selected 2 pairs of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells and 2 pairs of oxaliplatin-resistant colon

Figure 3. Repair inhibition of UV-C-induced DNA lesions by PM01183 and trabectedin. UDS in AS198 primary fibroblasts after exposure to different concentrations of PM01183 (A) or trabectedin (B) for 1 hour followed by UV-C irradiation at the indicated doses. C, excision of 6-4 PPs in NER-proficient and XPA-deficient primary fibroblasts. The cells were preincubated in the absence or presence of PM01183 or trabectedin (100 nmol/L) for 1 hour followed by UV irradiation and postincubation for the indicated times. The presence of 6-4 PP adducts was revealed by using an anti-6-4 PP antibody and quantitative image analysis by the MetaMorph software. A minimum of 200 cells were analyzed per point. Values represent the average of at least 2 independent experiments. SDs are indicated by error bars when they exceed symbol size. PP, photoproduct.



carcinoma cells and determined the repair kinetics by UDS after UV irradiation. UV was the treatment of choice because the formation of UV adducts is not influenced by possible resistance mechanisms linked to altered drug uptake, intracellular distribution or metabolism, and leads to an immediate formation of well-characterized DNA adducts that are selectively removed by NER. The results show an important increase in NER activity in 3 of the 4 platinum-resistant cell lines (Fig. 4A–C), which is particularly pronounced for the oxaliplatin-resistant HCT-116 cells (Fig. 4C). In contrast, the NER activity had not changed for the oxaliplatin-resistant HT-29 cells (Fig. 4D) suggesting that the resistance of HT-29/oxa cells is mediated by other mechanism(s).

PM01183 and trabectedin show activity toward cells with acquired platinum resistance

Decreased NER activity is typically associated with increased resistance to trabectedin in repair-deficient mutants. By extension, we speculated that the increased NER activity observed in most of our platinum-resistant cell lines (Fig. 4) might be accompanied by increased sensitivity to PM01183 and trabectedin. For comparison, we also determined the cytotoxic activity of S23906, cisplatin, and oxaliplatin toward the 4 pairs of platinum-resistant cells. The results show that the 2 cisplatin-selected cell lines were approximately 15-fold more resistant to cisplatin, compared with the parental cells,

whereas the oxaliplatin-selected cell lines were 9- to 12-fold resistant to oxaliplatin (Fig. 4E and Supplementary Figs. S1 and S2).

Three of the 4 platinum-resistant cell lines showed increased resistance to cisplatin, oxaliplatin, and S23906 (Fig. 4E and Supplementary Figs. S1 and S2). The exception was the oxaliplatin-resistant HT-29 cells that showed unchanged sensitivity to cisplatin, S23906, PM01183, and trabectedin (Fig. 4E and Supplementary Fig. S2). This is also the only of the 4-resistant cell lines with unchanged NER activity (Fig. 4D).

In comparison, 3 of 4 platinum-resistant cells showed no cross-resistance to PM01183 or trabectedin, whereas the fourth cell line, HCT-116/oxa showed 2- to 3-fold increased sensitivity to the 2 ecteinascidins (Fig. 4E and Supplementary Figs. S1 and S2). Interestingly, it is the same cells that displayed the highest increase in NER activity (Fig. 4C).

Combinations of PM01183 and cisplatin are synergistic toward cisplatin-sensitive and -resistant cells

Combinations of cisplatin and trabectedin have shown synergistic activity in both cellular and xenografts models (34, 35) including the ovarian cancer cell lines used in the present work. More recently, the combination of the 2 drugs has showed initial activity in ovarian cancer patients in a phase I study although the optimal

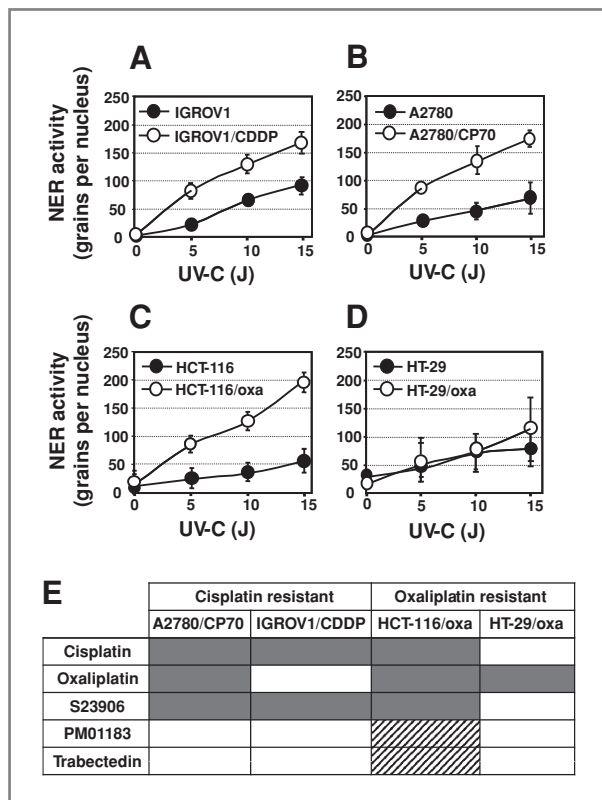


Figure 4. NER activity in cells with acquired platinum resistance. NER activity in cisplatin-resistant IGROV1/CDDP (A) and A2780/CP70 (B) cells or in oxaliplatin-resistant HCT-116/oxa (C) and HT-29/oxa (D) cells as compared with the corresponding parental cells following exposure to UV radiation at the indicated doses. Grains were counted for at least 100 individual nuclei, and the values are average of 2 independent experiments. SDs are indicated by error bars when they exceed symbol size. E, parental and platinum-resistant cells were exposed to cisplatin, oxaliplatin, S23906, PM01183, or trabectedin as described in Materials and Methods followed by the MTT assay. Resistance levels were calculated as the ratio between the IC_{50} value for the resistant cell line divided by the IC_{50} value for the corresponding parental cells. Dark box, resistance or cross-resistance; white box, unchanged sensitivity; hatched box, increased sensitivity of the indicated platinum-resistant cells compared with the parental cells.

scheduling and duration remains to be established (36). We therefore wished to establish if combinations of PM01183 and cisplatin were also active.

Ovarian A2780 carcinoma cells were exposed to different concentrations of PM01183 in the presence of fixed concentrations of cisplatin corresponding to the IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} , and IC_{50} concentrations followed by the MTT viability assay (Fig. 5A and Supplementary Table S3A). Alternatively, A2780 cells were exposed to different concentrations of cisplatin in the presence of fixed concentrations of PM01183 corresponding to the IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} , and IC_{50} concentrations (Fig. 5B and Supplementary Table S3B). To obtain the CI, the functional interactions between drugs were determined using the median-effect plot analysis according to Chou and Talalay (30). A CI value below 0.8 indicates synergy,

above 1.2 antagonism, whereas a CI between 0.8 and 1.2 corresponds to an additive effect (29). For both protocols, most combinations were synergistic with average CI values between 0.43 and 0.85. The only exceptions were observed for low concentrations (IC_{10}) of cisplatin (Supplementary Table S3A) with an average CI of 1.62 and for high concentrations (IC_{50}) of PM01183 (Supplementary Table S3B) with an average CI of 1.23.

Because PM01183 is active toward platinum-resistant cells, combinations of PM01183 and cisplatin were also tested for cisplatin-resistant A2780/CP70 cells. The results show that most combinations were synergistic with CI values between 0.42 and 0.89 (Fig. 5C and Supplementary Table S4). The exception was observed for low concentrations (IC_{10}) of cisplatin, which resulted in an average CI value of 1.28. Similar results were obtained for the cisplatin-resistant IGROV1 cells (data not shown). These findings show that combinations of PM01183 and cisplatin are synergistic under most conditions in agreement with previous results for combinations of trabectedin and cisplatin (34, 35).

Discussion

We here characterize the activity of PM01183, a novel covalent DNA minor groove binder in clinical development, in comparison with trabectedin. The 2 compounds are structurally similar except for the C subunit. The altered C subunit in PM01183 is associated with differences *in vivo* as shown by the altered pharmacokinetics of PM01183 in cancer patients (1). Early studies suggested that the C subunit was crucial for the biological activity of trabectedin (37–39). However, more recent findings suggest that this chemical group may be modified without loss of biological activity (3, 40). In agreement, we and others show that trabectedin and PM01183 have comparable cytotoxic effects toward a wide range of tumor cell lines (2 and this study).

Similar controversy surrounds the impact of the C subunit for the interaction with NER proteins. The A and B subunits of trabectedin are primarily responsible for the binding to the minor groove of DNA, whereas the C subunit that protrudes outside of the DNA minor groove is capable of interaction with nuclear proteins (6, 10, 39, 41). One study reports that the C subunit is essential for interaction with NER proteins (3), whereas another study found that the C subunit had no influence (4). To clarify this important question, we determined the NER activity by the UDS assay, which is the established assay for diagnosis of the NER-deficient syndrome, *Xeroderma pigmentosum* (42) and that measures DNA repair synthesis, the last step of the NER pathway. Our results clearly indicate that neither PM01183 nor trabectedin is repaired by NER. Specifically, the results show the absence of UDS following exposure to PM01183 or trabectedin, in clear contrast to what is observed after treatment with UV or S23906, another covalent DNA minor groove binder with similar binding specificity as

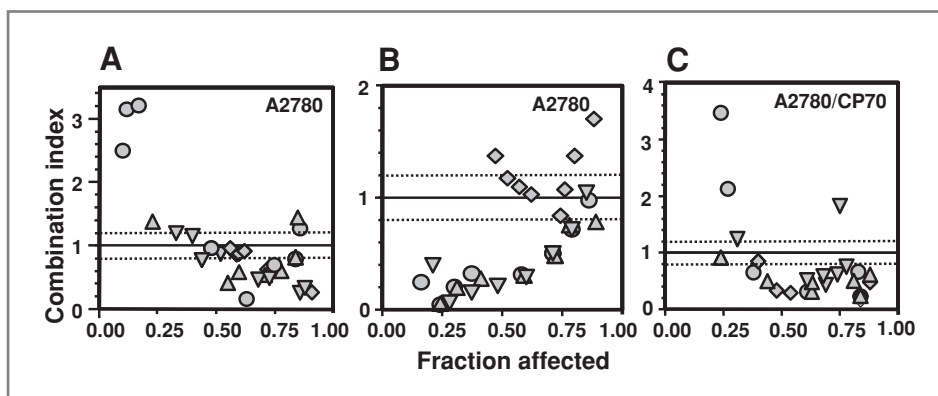


Figure 5. Cytotoxic activity of PM01183 and cisplatin combinations in ovarian carcinoma cells as determined by Chou and Talalay. A, exposure of cisplatin-sensitive A2780 cells to increasing concentrations of PM01183 in combination with cisplatin at concentrations corresponding to the IC₁₀ (circles), IC₂₀ (triangles), IC₃₀ (inverted triangles), and IC₅₀ (diamonds) values. B, cisplatin-sensitive A2780 exposed to increasing concentrations of cisplatin and fixed concentrations of PM01183 at the IC₁₀ (circles), IC₂₀ (triangles), IC₃₀ (inverted triangles), and IC₅₀ (diamonds) values. C, cisplatin-resistant A2780/CP70 cells were exposed to increasing concentrations of PM01183 in combination with fixed concentrations of cisplatin at the IC₁₀ (circles), IC₂₀ (triangles), IC₃₀ (inverted triangles), and IC₅₀ (diamonds) values.

the ecteinascidins. We then characterized lesion excision, the second-last step of the NER pathway in proliferating cells. The results show that the stability of biotinylated trabectedin adducts is comparable for NER-proficient and -deficient cells, in full agreement with the UDS results. Although the interaction between the ecteinascidins and the NER machinery has previously been studied in repair-deficient mammalian cells and in yeast, this is to the best of our knowledge the first direct demonstration of the absence of repair of ecteinascidin lesions by NER in living cells.

The absence of NER repair could be because the PM01183- and trabectedin-induced DNA lesions are not recognized by the NER machinery. Alternatively, the lesions might be recognized initially by NER proteins but then arrested at one of the subsequent steps as previously suggested. To distinguish between these 2 possibilities, we assumed that if PM01183- or trabectedin adducts were indeed recognized by NER proteins, they would act as decoys able to sequester NER components thereby attenuating the repair of true NER substrates such as UV adducts. A similar model has previously been proposed for RNA Pol II, where the need for common factors (e.g., TFIIF) during the initial step of both repair and transcription decreases the ability of the initiating Pol II to proceed to elongation (27). Our results show that PM01183 and trabectedin have comparable ability to inhibit the removal and repair of UV-induced lesions. Interestingly, the fact that we observe a delayed repair rather than complete inhibition of the NER process suggest that the sequestration of NER components is not an irreversible phenomenon, but follows an equilibrium between bound and free forms. This hypothesis is enforced by the fact that even at high concentration of PM01183, the level of NER inhibition does not exceed 50%. Thus, although our results do not exclude that some modifications of the C subunit might lead to loss of

recognition by NER proteins, this is clearly not a universal rule, because PM01183 and trabectedin show comparable activity with respect to their capacity to interfere with NER despite the differences in their C subunit.

Decreased NER activity in repair-deficient cells is accompanied by increased resistance to trabectedin. By extension, we speculated that cells with increased NER activity might show increased sensitivity to trabectedin. However, this issue has, to the best of our knowledge, not been addressed so far. We first characterized the NER activity in 2 pairs of cisplatin-resistant and 2 pairs of oxaliplatin-resistant cells in comparison with their corresponding parental cells. The results show that acquired platinum resistance was accompanied by increased NER activity in 3 of the 4 cell lines, which was particularly pronounced for the oxaliplatin-resistant HCT-116 cells. These findings confirm the role of NER in the resistance to platinum derivatives.

We then determined the sensitivity of the 4 platinum-resistant cell lines to PM01183 and trabectedin in comparison with the corresponding parental cells. Three of 4 platinum-resistant cell lines showed no cross-resistance to PM01183 or trabectedin, whereas the fourth cell line, HCT-116/oxa, showed 2- to 3-fold increased sensitivity to the 2 ecteinascidins. Interestingly, it is also the HCT-116/oxa cells that displayed the highest increase in NER activity, suggesting that collateral sensitivity to PM01183 or trabectedin may only be observed when comparing cells with important difference in NER activity. These findings were specific for the 2 ecteinascidins, because S23906 displayed a sensitivity profile that was comparable with cisplatin.

Combinations of cisplatin and trabectedin have shown synergistic activity in both cellular and xenografts models including the ovarian cancer cell lines used in the present work (34, 35) and with initial indications of activity in the clinical setting (36). We therefore wished to establish if

combinations of PM01183 and cisplatin were also active. Most of the combinations were synergistic, except for low concentrations (IC₁₀) of cisplatin or high concentrations (IC₅₀) of PM01183. In the latter case, it is likely that the lack of additivity/synergism is due the potent cytotoxic activity of PM01183, which induces rapid cell death rather than modulating the NER activity. These findings suggest that moderate concentrations of PM01183 might be more synergistic than high doses when combined with cisplatin. Interestingly, most combinations of PM01183 and cisplatin were also synergistic when tested on platinum-resistant cells.

It should be noted that our observations for the platinum-resistant cells have a potential caveat, because these cells were selected for resistance to platinum rather than for resistance to platinum-containing drug combinations, in contrast to the clinical situation. Therefore, it can not be excluded that agents administered in combination with platinum compounds as first-line treatment could select for resistance mechanisms that might influence the activity of the ecteinascidins. This is particularly true with respect to drug-efflux pumps, because trabectedin is a substrate for ABCB1/P-glycoprotein (43).

In conclusion, we here show for the first time that although neither trabectedin nor PM01183 is repaired by NER, both compounds are able to interfere with the NER machinery thereby attenuating the repair of specific NER substrates. We further show that the NER activity is increased in 3 of 4 cellular models with acquired resistance to cisplatin or oxaliplatin confirming the involvement of NER in the resistance to platinum derivatives. Importantly, trabectedin and PM01183

show either unchanged or enhanced activity toward all cisplatin- or oxaliplatin-resistant cell lines in extension of previous findings with trabectedin in NER-deficient mutants. Our data clearly show that the C subunit can be subjected to at least some structural modifications without loss of activity or interaction with NER proteins. While PM01183 and trabectedin show comparable activity in cellular models, it is likely that the differences in pharmacokinetics will allow different dosing and scheduling of PM01183 in the clinic that may lead to novel and/or increased antitumor activity. Taken together, our results provide a mechanistic basis to support clinical trials of PM01183 alone or in combination with cisplatin.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

A.K. Larsen has received partial research funding from PharmaMar.

Grant Support

This work was supported in part by Conticanet (EU Network of connective tissue cancers), CAPES/COFECUB (French-Brazilian collaborative research grant No. 583/07) and PharmaMar. D.G. Soares was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Villejuif, France. M.S. Machado was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

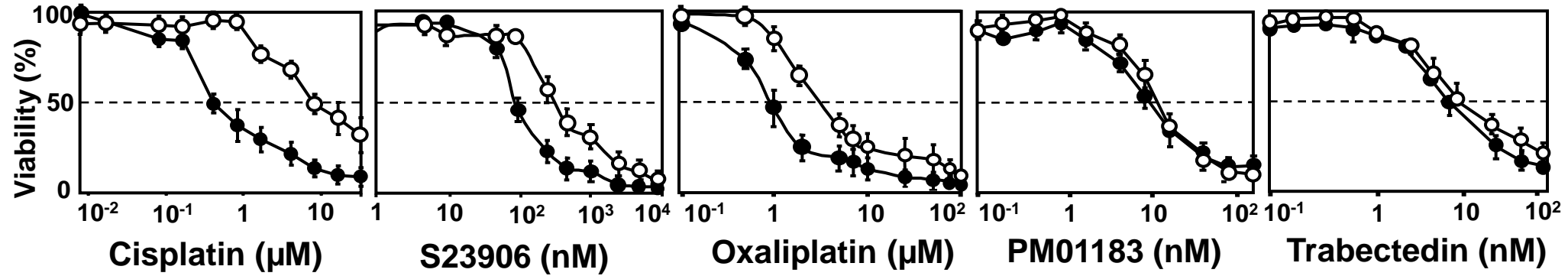
Received April 4, 2011; accepted May 18, 2011; published OnlineFirst May 27, 2011.

References

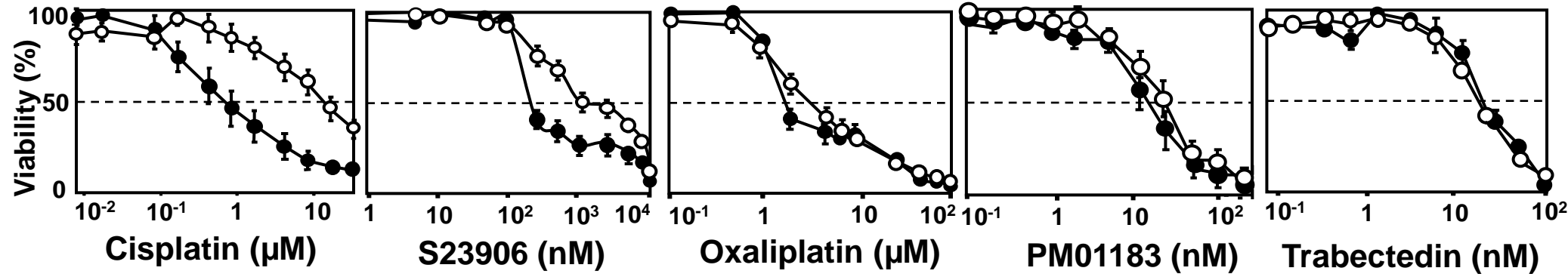
- Ratain MJ, Elez ME, Szyldergemajn S, Geary D, Kang SP, Maraculla T, et al. First-in-man phase I study of PM01183 using an accelerated titration design [abstract 434]. *Eur J Cancer Suppl* 2010;8:137–8.
- Leal JF, Martínez-Díez M, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, et al. PM01183, a new DNA minor-groove covalent binder with potent in vitro and in vivo antitumor activity. *Br J Pharmacol* 2010;161:1099–110.
- Guirouilh-Barbat J, Antony S, Pommier Y. Zalypsis (PM0104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2007–14.
- Erba E, Cavallaro E, Damia G, Mantovani R, Di Silvio A, Di Francesco AM, et al. The unique biological features of the marine product Yondelis (ET-743, trabectedin) are shared by its analog ET-637, which lacks the C ring. *Oncol Res* 2004;14:579–87.
- Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, et al. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 2001;37:97–105.
- Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, et al. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 2001;7:961–6.
- Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guily J, Soria JC, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3855–9.
- Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2010;9:745–53.
- Rocca CJ, Poindessous V, Soares DG, Ouadrani KE, Sarasin A, Guérin E, et al. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *Biochem Pharmacol* 2010;80:335–43.
- Herrero AB, Martín-Castellanos C, Marco E, Gago F, Moreno S. Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res* 2006;66:8155–62.
- Soares DG, Poletto NP, Bonatto D, Salvador M, Schwartzmann G, Henriques JA. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol* 2005;70:59–69.
- Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, et al. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13062–7.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1475–85.
- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9–23.

15. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63:12–31.
16. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008;14:1291–5.
17. Sessa C, De Braud F, Perotti A, Bauer J, Curigliano G, Noberasco C, et al. Trabectedin for women with ovarian carcinoma after treatment with platinum and taxanes fails. *J Clin Oncol* 2005;23:1867–74.
18. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3107–14.
19. McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* 2001;2:483–90.
20. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, et al. The structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2004;24:5776–87.
21. Al-Minawi AZ, Saleh-Gohari N, Helleday T. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2008;36:1–9.
22. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2008;28:5082–92.
23. Bhagwat N, Olsen AL, Wang AT, Hanada K, Stuckert P, Kanaar R, et al. XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair. *Mol Cell Biol* 2009;29:6427–37.
24. Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, et al. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculofacio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet* 2007;80:457–66.
25. Bhagwat NR, Roginskaya VY, Acquafondata MB, Dhir R, Wood RD, Niedernhofer LJ. Immunodetection of DNA repair endonuclease ERCC1-XPF in human tissue. *Cancer Res* 2009;69:6831–8.
26. Sarasin A, Blanchet-Bardon C, Renault G, Lehmann A, Arlett C, Dumez Y. Prenatal diagnosis in a subset of trichothiodystrophy patients defective in DNA repair. *Br J Dermatol* 1992;127:485–91.
27. Escargueil AE, Poindessous V, Soares DG, Sarasin A, Cook PR, Larsen AK. Influence of irifolven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci* 2008;121:1275–83.
28. Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Comisso M, Waters SJ, Larsen AK. Marked activity of irifolven toward human carcinoma cells: comparison with cisplatin and ecteinascidin. *Clin Cancer Res* 2003;9:2817–25.
29. Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Cvitkovic E, Waters SJ, Larsen AK. Enhanced antitumor activity of irifolven in combination with 5-fluorouracil and cisplatin in human colon and ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 2003;23:1347–55.
30. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010;70:440–6.
31. David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Kouach M, Briand G, Pierré A, et al. Alkylation of guanine in DNA by S23906–1, a novel potent antitumor compound derived from the plant alkaloid acronycine. *Biochemistry* 2002;41:9911–20.
32. David-Cordonnier MH, Laine W, Lansiaux A, Rosu F, Colson P, de Pauw E, et al. Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism. *Mol Cancer Ther* 2005;4:71–80.
33. Casado JA, Río P, Marco E, García-Hernández V, Domingo A, Pérez L, et al. Relevance of the Fanconi anemia pathway in the response of human cells to trabectedin. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1309–18.
34. Scotlandi K, Perdichizzi S, Manara MC, Serra M, Benini S, Cerisano V, et al. Effectiveness of ecteinascidin-743 against drug-sensitive and -resistant bone tumor cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3893–903.
35. D'Incalci M, Colombo T, Ubezio P, Nicoletti I, Giavazzi R, Erba E, et al. The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *Eur J Cancer* 2003;39:1920–6.
36. Sessa C, Cresta S, Noberasco C, Capri G, Gallerani E, De Braud F, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of trabectedin and cisplatin in solid tumours. *Eur J Cancer* 2009;45:2116–22.
37. Sakai R, Rinehart KL, Guan Y, Wang AH. Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: crystal structures and activities in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11456–60.
38. Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn KW. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 1996;35:13303–9.
39. Zewail-Foote M, Hurley LH. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *J Med Chem* 1999;42:2493–7.
40. Martinez EJ, Corey EJ, Owa T. Antitumor activity- and gene expression-based profiling of ecteinascidin Et 743 and phthalascidin Pt 650. *Chem Biol* 2001;8:1151–60.
41. D'Incalci M, Galmarini CM. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2157–63.
42. Moriwaki S, Kraemer KH. *Xeroderma pigmentosum*-bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001;17:47–54.
43. Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Ronzoni S, Di Liberti G, Muradore I, et al. Isolation and characterization of an IGROV-1 human ovarian cancer cell line made resistant to Ecteinascidin-743 (ET-743). *Br J Cancer* 2000;82:1732–9.

(A)



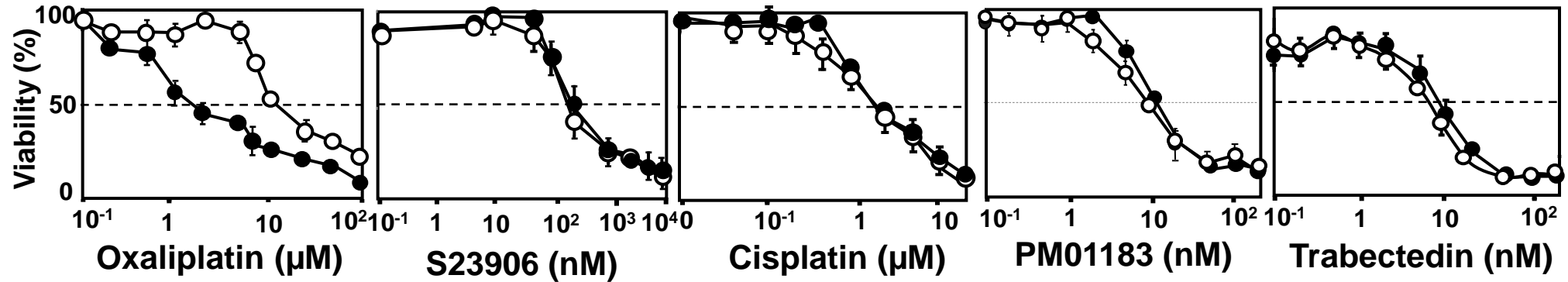
(B)



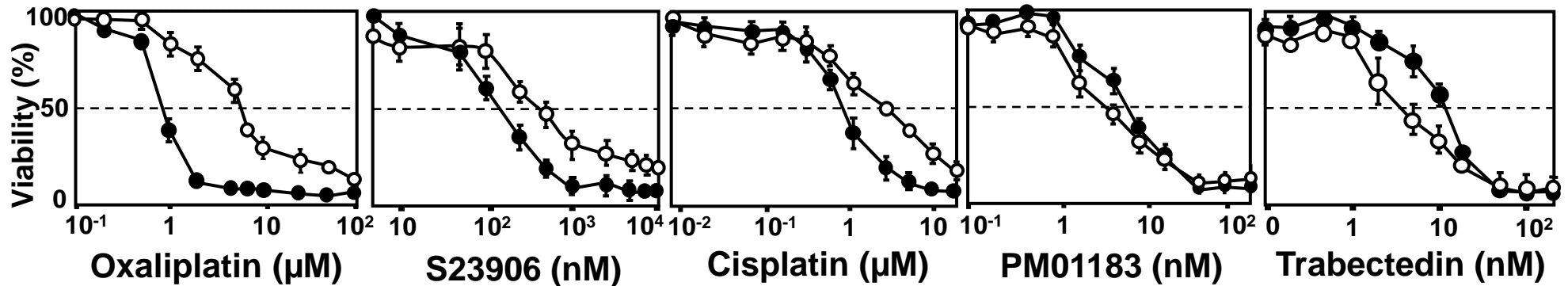
S1.

Cytotoxic activities of alkylating agents toward cisplatin-sensitive and -resistant cell lines. (A) A2780 and its cisplatin-resistant variant A2780/CP70 or (B) IGRov1 and its cisplatin-resistant variant IGROv1/CDDP were exposed to either PM01183, trabectedin or S23906 for 1 h or to either cisplatin or oxaliplatin for 120 h. The viability was determined by the MTT assay after five generation times. All curves represent an average of at least three independent experiments, each done in duplicate. Error bars represent standard errors and are indicated when they exceed symbol size. Symbols: Closed circles, parental cells; open circles, the corresponding cisplatin-resistant cells.

(A)



(B)



S2.

Cytotoxic activities of different alkylating agents toward oxaliplatin-sensitive and -resistant cell lines. (A) HT-29 and its oxaliplatin-resistant variant HT-29/oxa or **(B)** HCT-116 and its oxaliplatin-resistant variant HCT-116/oxa were exposed to either PM01183, trabectedin or S23906 for 1 h or to either oxaliplatin or cisplatin for 120 h. The viability was determined by the MTT assay after four generation times. All curves represent an average of at least three independent experiments, each done in duplicate. Error bars represent standard errors and are indicated when they exceed symbol size. Symbols: closed circles, parental cells; open circles, the corresponding oxaliplatin-resistant cells

(A)

	Cisplatin			
PM01183 (nM)	IC ₁₀	IC ₂₀	IC ₃₀	IC ₅₀
0.05	2.527	-	1.235	0.989
0.1	3.181	1.411	0.813	0.899
0.2	3.236	0.452	1.188	0.908
0.5	0.995	0.516	0.903	0.952
1	0.193	0.570	0.500	0.661
2	0.731	0.630	0.525	0.688
5	0.827	0.856	0.287	0.364
10	1.306	1.476	0.368	0.303
<i>Average combination index</i>	1.62	0.86	0.73	0.72
<i>CI 95%</i>	[0.80 – 2.43]	[0.55 – 1.17]	[0.48 – 0.98]	[0.54 – 0.91]

(B)

	PM01183			
Cisplatin (μM)	IC ₁₀	IC ₂₀	IC ₃₀	IC ₅₀
0.016	0.269	-	0.419	1.398
0.03	0.069	0.079	0.088	1.198
0.16	0.228	0.22	0.177	1.119
0.33	0.347	0.301	0.236	1.052
0.66	0.338	0.327	0.316	0.862
1.66	0.526	0.506	0.526	1.095
3.33	0.741	0.778	0.741	1.398
6.66	1.001	0.806	1.067	1.725
<i>Average combination index</i>	0.44	0.43	0.45	1.23
<i>CI 95%</i>	[0,23 - 0,67]	[0,23 - 0,64]	[0,22 - 0,67]	[1,05 – 1,42]

S3.

Combination index values for different combinations of PM01183 and cisplatin in cisplatin-sensitive A2780 ovarian cancer cells as calculated by Chou and Talalay. The end points of the confidence interval (CI 95%) are shown between the brackets.

	Cisplatin			
PM01183 (nM)	IC10	IC20	IC30	IC50
0.05	-	0.954	1.290	-
0.1	3.510	0.539	0.555	0.893
0.2	2.168	0.351	0.473	0.375
0.5	0.697	0.530	0.629	0.333
1	0.353	0.274	0.658	0.128
2	0.269	0.542	0.760	0.269
5	0.709	0.655	1.871	0.525
Average combination index	1.28	0.77	0.42	0.42
CI 95%	[0,25 - 1,54]	[0,39 - 0,71]	[0,50 – 1.27]	[0,21 - 0,63]

S4.

Combination index values for different combinations of PM01183 and cisplatin in A2780/CP70 cisplatin-resistant ovarian cancer cells as calculated by Chou and Talalay. The end points of the confidence interval (CI 95%) are shown between the brackets.

CAPÍTULO III

3'3-DITRIFLUOROMETHYLDIPHENYL DISELENIDE: A NEW ORGANOSELENIUM COMPOUND WITH INTERESTING ANTIGENOTOXIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES

Artigo publicado na revista

Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

No presente Capítulo, será ilustrado o artigo elaborado sobre as atividades antigenotóxicas, antimutagênicas e antioxidantes do composto 3'3'-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD) em diferentes modelos biológicos. Neste trabalho, demonstrou-se que o DFDD é capaz de proteger linhagens de bactérias e leveduras contra a mutagenicidade induzida pelo agente oxidante peróxido de hidrogênio. Utilizando fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79), foi verificado que o DFDD em altas concentrações induz um fraco efeito genotóxico enquanto que em baixas concentrações este agente protegeu as células contra os danos no DNA causados pelo peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, foi detectado que o DFDD tem a habilidade de agir diretamente na molécula do peróxido de hidrogênio, descrevendo pela primeira vez uma ação catalase-*like* de um composto orgânico de selênio. Este artigo foi aceito para a publicação no periódico *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gen tox
Community address: www.elsevier.com/locate/mut res



3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities

Miriana da Silva Machado^a, Izabel Vianna Villela^a, Dinara Jaqueline Moura^a, Renato Moreira Rosa^b, Mirian Salvador^c, Norberto P. Lopes^d, Antonio Luiz Braga^e, Rafael Roesler^{f,g}, Jenifer Saffi^{a,b}, João Antonio P. Henriques^{a,b,c,*}

^a Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Curso de Farmácia e Biomedicina e Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada-PPGGTA - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

^c Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^d Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^f Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2008

Received in revised form 15 January 2009

Accepted 20 January 2009

Available online 3 February 2009

Keywords:

3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide

Genotoxicity

Mutagenicity

ABSTRACT

The trace element selenium (Se), once known only for its potential toxicity, is now a well-established essential micronutrient for mammals. The organoselenium compound diphenyl diselenide (DPDS) has shown interesting antioxidant and neuroprotective activities. On the other hand, this compound has also presented pro-oxidant and mutagenic effects. The compound 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD), a structural analog of diphenyl diselenide, has proven antipsychotic activity in mice. Nevertheless, as opposed to DPDS, little is known on the biological and toxicological properties of DFDD. In the present study, we report the genotoxic effects of the organoselenium compound DFDD on *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* and Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). DFDD protective effects against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced DNA damage *in vitro* are demonstrated. DFDD did not cause mutagenic effects on *S. typhimurium* or *S. cerevisiae* strains; however, it induced DNA damage in V79 cells at doses higher than 25 μM, as detected by comet assay. DFDD protected *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* against H₂O₂-induced mutagenicity, and, at doses lower than 12.5 μM, prevented H₂O₂-induced genotoxicity in V79 cells. The *in vitro* assays demonstrated that DFDD mimics catalase activity better than DPDS, but neither presents superoxide dismutase action. The products of the reactions of DFDD or DPDS with H₂O₂ were different, as determined by electrospray mass spectrometry analysis (ESI-MS). These results suggest that DFDD is not mutagenic for bacteria or yeast; however, it may induce weak genotoxic effects on mammalian cells. In addition, DFDD has a protective effect against H₂O₂-induced damage probably by mimicking catalase activity, and the distinct products of the reaction DFDD with H₂O₂ probably have a fundamental role in the protective effects of DFDD.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The trace element selenium (Se), once known only for its potential toxicity, is now also a well-established essential micronutrient for mammals [1]. Selenium is a constituent of several selenoproteins, including glutathione peroxidase, thioredoxin reductase,

selenoprotein P, and selenoprotein R, which are primarily involved in antioxidant functions and maintenance of redox state [2–5]. The interest in organoselenide chemistry and biochemistry has increased in the last two decades mainly due to the fact that a variety of organoselenium compounds revealed molecules that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotective, anti-tumoral, and anti-infectious agents, as well as cytokine inducers and immunomodulators [1,6–8].

Diphenyl diselenide (DPDS) (Fig. 1A) is a simple and stable organoselenide used in the synthesis of a variety of pharmacologically active organoselenium compounds [8]. DPDS biological activities have been widely studied, and has shown very interesting pharmacological effects, such as antioxidant, hepatoprotective,

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica – Prédio 43422 – Laboratório 210, Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia – CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33086069; fax: +55 51 33089527.

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques).

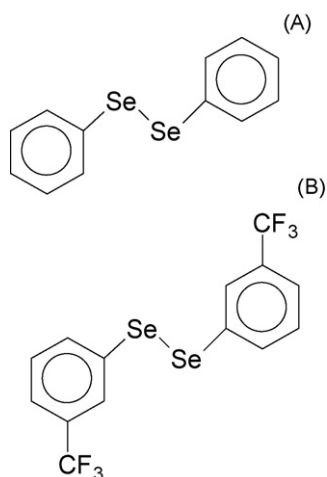


Fig. 1. Chemical structure of diphenyl diselenide (DPDS; A) and 3,3-difluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD; B).

neuroprotective, anti-inflammatory, and antinociceptive properties [7,8]. However, DPDS also presents some toxic effects. Chronic exposure to high DPDS doses causes central effects in mice brain, and there are evidences of teratogenic effects in mice [7–9].

Moreover, it was shown that DPDS acts as pro-oxidant by depleting free glutathione (GSH), and that it is able to induce frameshift mutations in *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as increased frequencies of crossing over and gene conversion in *S. cerevisiae* diploid strains [10]. It was recently demonstrated that high DPDS concentrations generate DNA strand breaks, as observed using comet assay, and increase the number of binucleated cells in Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells), as analyzed by micronucleus assay [11]. In addition, elevated DPDS doses can induce DNA strand breaks in mice brain, testis, liver, and kidneys [12]. However, at lower doses, this molecule has antioxidant and antimutagenic effects on V79 cells, protecting them against oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), methylmethane sulfonate (MMS), and UVC radiation by enhancing glutathione peroxidase activity [13].

Using DPDS as a prototype compound, the derivative 3,3-difluoromethyldiphenyl diselenide [(3- CF_3 PhSe) $_2$], DFDD, Fig. 1B) was developed. In contrast with its structural analog DPDS, little is known on the biological and toxicological properties of DFDD. Nogueira et al. showed that DFDD was not neurotoxic to mice at the same doses that DPDS caused seizures in this species [14]. Moreover, those authors demonstrated that DPDS had better antioxidant potential than DFDD against lipid peroxidation in mice brain homogenates [15]. The authors suggested that differences in neurotoxic and antioxidant effects presented by these compounds may be related to the CF_3 functional group present in the DFDD aromatic ring [14,15].

We recently demonstrated that DFDD is able to attenuate apomorphine-induced stereotypy at a dose that did not affect other behavioral parameters [16]. Considering these interesting DFDD activities, and the lack of data on the potential biological and genotoxic effects of this diselenide, the aim of this study was to investigate the genotoxic activity of DFDD using three experimental models: *S. typhimurium*, *S. cerevisiae* and Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). The possible protective effects of DFDD against DNA damage induced by hydrogen peroxide were also evaluated. In an attempt to verify the nature of the protective effect of DFDD against oxidative mutagenesis, we evaluated catalase (Cat)-like and superoxide dismutase (Sod)-like activities of DFDD and DPDS. Also, electrospray ionization mass spectrometry was used to

determine the reaction products of DFDD and DPDS with hydrogen peroxide.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

DFDD was synthesized as previously described [17,18], and dissolved in dimethyl sulfoxide immediately prior to use in each assay. The analysis of 1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that DPDS and DFDD analytical and spectroscopic data fully agreed with their assigned structures. The chemical purity of DPDS and DFDD (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography (GC/HPLC) [17,18]. Aroclor 1254-induced S9 rat liver fraction was purchased from Moltax (Annapolis, MD, USA). S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames [19]. All other chemicals were of analytical grade, and were obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Cytotoxicity evaluation by colony-forming ability in V79 cells

Chinese hamster lung fibroblast cells (V79 cells) were cultured under standard conditions as previously described [20]. One day prior to treatment, cells were harvested with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS), and 200 cells were seeded per 25- cm^2 flask to determine colony-forming ability [20]. DFDD was dissolved in DMSO at a final concentration of 0.2% and the control group was exposed to an equivalent concentration of this solvent. Treatment was performed with graded DFDD concentrations (1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) for 3 h in FBS-free medium at 37 °C. After treatment, cells were washed and incubated in complete medium at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 7 days. Colonies were fixed with 3% formaldehyde, stained with 1% crystal violet, counted, and their survival expressed as a percentage relative to the negative control treatment. The concentration was considered cytotoxic when cell survival was 50%.

2.3. Comet assay using V79 cells

Exponentially growing V79 cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL of complete medium in a 25- cm^2 flask, and grown for 2 days to 90–100% confluence prior to the treatment with the test substance. Cells were incubated at 37 °C for 3 h with DFDD (1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μM) or MMS 40 μM . The vehicle (DMSO) was used as negative control. Oxidative challenge with 150 μM H_2O_2 was carried out for 5 min at 4 °C, in the dark, and in FBS-free medium.

Alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [21], with minor modifications [11,22,23]. For the analysis, images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were observed per experimental group. Cells were also visually scored into five classes, according to tail length: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with tail 1–2 \times longer than the diameter of the head; (4) class 3: with a tail 2 \times longer than the diameter of the head; (5) class 4: significant damage, with a long tail, measuring more than 3 \times the diameter of the head [24]. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class [11,24]. Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) [23,24]. When selecting cells, edges and cells around air bubbles were disregarded [24]. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments.

2.4. *Salmonella*/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by [19,25]. TA97a (detects frameshift mutation in DNA target -C-C-C-C-C-C-; +1 cytosine), TA98 (detects frameshift mutation in DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G-), TA100 (base-pair substitution mutation results from the substitution of one leucine [GAG] by one proline [GGG]) and TA102 (base-pair substitution, oxidative and cross-linking mutagens) *S. typhimurium* strains were used [26,27]. Bacterial cultures ($1-2 \times 10^9$ cells/mL) were incubated in the dark at 37 °C with different amounts of DFDD in the presence or absence of metabolic activation (S9 mix) for 20 min, without shaking. Then, soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 μM histidine, 50 μM biotin, pH 7.4, 42 °C) was added, and the contents of the test tube were immediately poured onto a minimal agar plate (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). Aflatoxin B $_1$ (1 μg /plate) was used as positive control for all strains (in the presence of metabolic activation with S9 mix), 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO, 0.5 μg /plate) for TA97a, TA98, and TA102, and sodium azide (1 μg /plate) for TA100 (absence of S9 mix). In order to improve DNA intercalation analysis, a minor modification of the standard method was used: strain TA97a was treated with DFDD at 37 °C for 4 h in culture medium before plating on minimal agar. TA102 was also used to assess DFDD protective effect against mutagenesis induced by hydrogen peroxide (100 μg /plate). The pre-incubation procedure was as follows: DFDD was incubated with the culture at 37 °C without shaking for 20 min [10]. The oxidative mutagen was then added, and the mixture was further incubated at 37 °C for 20 min, followed by plating on appropriate media. Triplicate plates

were used for the test substance and the negative (solvent) and positive controls. Plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting revertant colonies.

2.5. Detection of DFDD-induced reverse and frameshift mutations in *S. cerevisiae*

Mutagenesis was measured in *S. cerevisiae*, strain XV185-14c (MAT α *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*, R.C. Von Borstel, Edmonton, Canada) [10]. A suspension of 2×10^8 cells/mL treated in PBS, in stationary phase, was incubated at 30 °C for 18 h with three DFDD concentrations (40, 80, and 120 μ M). These concentrations were chosen based in a previous survival assay, where doses higher than 120 μ M showed more than 50% growth inhibition (data not shown). 4-NQO (0.5 μ g/mL) was used as positive control. Survival was determined in SC (3–5 days, 30 °C), and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) in the appropriate omission media (5–7 days, 30 °C) [10]. Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutation at the locus itself [28], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [29], which can be reverted either by locus-specific or by forward mutation in a suppressor gene [30]. True reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus were differentiated according to Schuller and Von Borstel [31], where the reduced adenine content of the SC-lys medium shows locus reversions as red colonies and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [30].

In order to assess antimutagenic effects, cells were pre-treated with DFDD at same doses and conditions used in the mutagenic test described above, washed, and exposed to H₂O₂ (4 mM) at 30 °C for 1 h in the dark. After this treatment, appropriate cell dilutions were plated onto SC plates to determine cell survival, and cell suspension aliquots were plated on the appropriate omission media. Plates were incubated in the dark at 30 °C for 5–7 days before counting survivor and revertant colonies. All mutagenicity assays were repeated at least three times, and plating for each dose was conducted in triplicate.

2.6. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities

DFDD and DPDS were tested for H₂O₂ degradation ability in order to determine catalase-like activity (Cat-like activity). The assay was performed according to the method described by Aebi [32]. Its principle is based on the determination of H₂O₂ decomposition rate at 240 nm. This reaction was conducted at constant temperature (30 °C) for 1 min. One unit of catalase decomposed 1 μ mol of H₂O₂ per mg of protein in 1 min at pH 7.4.

DFDD and DPDS superoxide quenching ability or superoxide dismutase-like activity (Sod-like activity) was spectrophotometrically determined by measuring the inhibition of auto-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was maintained at 30 °C for 3 min [33]. One unit is defined the amount of enzyme that inhibits 50% of adrenochrome formation rate per gram of protein.

2.7. Gas chromatography and mass spectrometry

The stability of the DPDS and DFDD were analyzed by GCMS (gas chromatography using EI mass spectrometer detector) in a Shimadzu QP2010 apparatus with a 70 eV ionization source and fragmentation by electronic impact. 1.0 μ L samples were injected in a DB5-MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) at 260 °C. The analysis was carried out in split mode, with a split ratio of 50.0, 1 min sample time, column flow of 1.94 mL/min, linear velocity of 52.7 cm/s, and scanning between *m/z* 40 and *m/z* 600. Oven initial temperature was 140 °C, which was maintained 1 min. Temperature was increased 6 °C/min up to 260 °C, which was maintained for 10 min, then increased 20 °C/min up to 300 °C, which was maintained for 5 min. For compound identification, peaks were compared with standards, always consulting the WILEY7 library.

In order to verify DFDD and hydrogen peroxide or DPDS and hydrogen peroxide reaction products, we used electrospray mass spectrometry analysis (ESI-MS). DFDD and DPDS stock solutions were dissolved in acetonitrile–water (1:1, v/v) or DMSO, incubated with H₂O₂ at 37 °C for 1 h, and subsequently analyzed. High resolution ESI-MS analyses were performed in UltraTOF-Q (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Analyses were performed in negative-ion ESI mode, under the following conditions: capillary voltage 3400 V; drying gas temperature, 180 °C; drying gas flow, 4 L/h; nebulizer gas, nitrogen. NaTFA at 10 mM was used as standard for internal and external calibration. Samples were directly infused into the ionization source at a flow rate of 10 μ L/min using a Harvard Apparatus, model 1746 (Holliston, MA) syringe pump.

2.8. Data analysis

Mutagenicity data of bacteria were analyzed using Salmonel software [34]. In order to evaluate mutagenicity induction, Mutagenic Index (MI) was calculated as the number of his+ per plate in the studied sample divided by the number of his+ revertant per plate in the negative control. A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield (MI \geq 2); (b) a significant response was determined by anal-

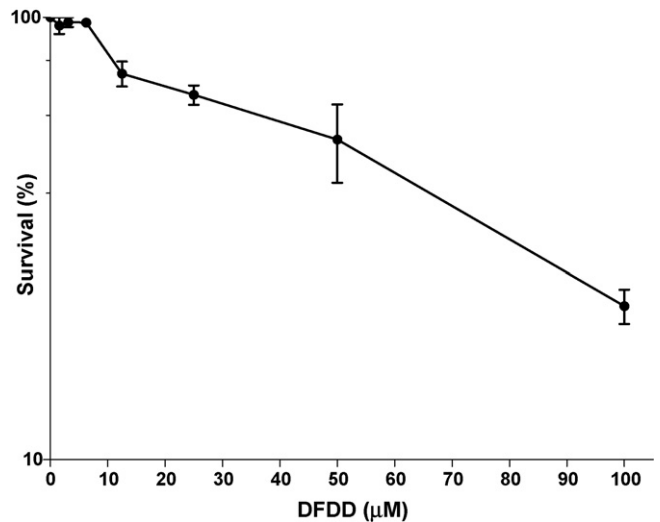


Fig. 2. DFDD-induced cytotoxicity in V79 cells.

ysis of variance (ANOVA) ($P \leq 0.05$); and (c) a reproducible positive dose–response ($P \leq 0.01$) was present. An effect was considered cytotoxic when $MI \leq 0.6$.

The percentage of H₂O₂ damage inhibition by DFDD in the TA102 strain was calculated as: % inhibition = $[1 - (B/A)] \times 100$, where A is the number of revertants on the plate containing only the mutagen, and B is the number of revertants on the plate containing the mutagen (H₂O₂) and the antimutagen (DFDD). The number of spontaneous revertants in the negative control was subtracted from A and B each, and statistically analyzed using analysis of variance and Tukey's multiple comparison test [35]. The dose inhibiting 50% mutagenicity was calculated in the dose–response curve and used as an indicator of antimutagenic potency.

Data from the mutagenicity assays with *S. cerevisiae*, genotoxicity tests with V79 cells, and Cat-like and Sod-like activities were statistically analyzed using analysis of variance and Tukey's multiple comparison test. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$ [36].

3. Results

3.1. Colony-forming ability in V79 cells

Dose-dependent changes in the viability of DFDD-treated cells were evaluated based on DFDD effects on V79 cell growth. Results in Fig. 2 show that DFDD has weak cytotoxic effects on V79 cells. However, at high concentrations, DFDD exerts cytotoxic effects, decreasing the relative survival to 23% at 100 μ M.

3.2. Genotoxic and antigenotoxic effects in V79 cells

Fig. 3 shows that DFDD did not cause significant DNA damage to V79 cells at concentrations lower than 25 μ M as compared to the negative control. In concentrations higher than 25 μ M, DFDD-induced DNA damage in a dose–response manner. As expected, exposure of V79 cells to MMS (40 μ M) resulted in a significant increase in DNA damage.

It is known that when cells are treated with H₂O₂, the predominant DNA lesion is strand break, although some bases are also oxidized. Strand break rejoining is normally rapid and a $t_{1/2}$ of about 10 min is typical [37]. Thus, in order to verify any possible DFDD antigenotoxic effect, we tested DFDD action against H₂O₂-induced DNA damage at 4 °C for 5 min. V79 cells were treated with DFDD for 3 h, and then exposed to H₂O₂ at 150 μ M (5 min, 4 °C). These DFDD concentrations were based on the colony-forming ability of the cells treated with DFDD as described above (Fig. 2). The ability of DFDD to reduce H₂O₂-induced DNA damage is shown in Fig. 4. When cells were pre-treated with this organoselenium compound, DNA damage was significantly reduced, as demonstrated by DI reduction at concentrations from 3.125 to 12.5 μ M. However, the higher concentrations of 25 and 50 μ M did not show any protective effects.

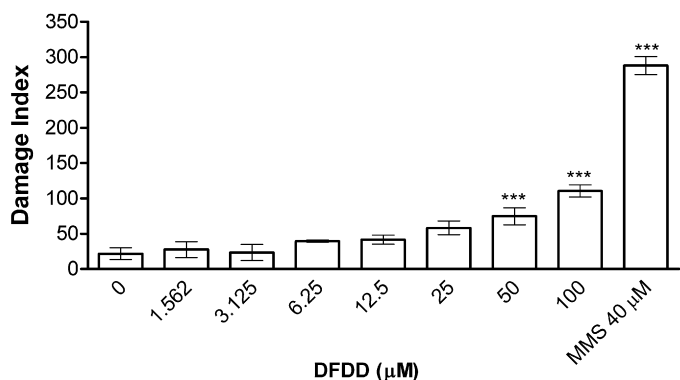


Fig. 3. Effect of DFDD or MMS (methylmethane sulfonate) on cell damage index in comet assay. V79 cells were exposed to DFDD for 3 h. Bars represent means values and standard deviations obtained from an average of 100 cells per experiment—total of three experiments per concentration of each substance. MMS was used as positive control. Data are significant in relation to negative control at *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA–Tukey's multiple comparison test.

3.3. Mutagenic and antimutagenic effects in *S. typhimurium*

DFDD was first tested for toxicity to TA100 strain using the same method used in the mutagenicity experiment. Concentrations of 8, 40, 200, 1000, and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, in the absence of metabolization, were used. The test substance was considered toxic if the Mutagenic Index (colony counts on the test plate/average counts on the negative control plates; MI) value was lower than 0.50 in at least two of the tested concentrations, and the background showed evidence of toxicity. The results of the range-finder experiment were used to define the dose range to be applied in the mutagenicity test, which concentration range should be the highest allowed by the toxicity or the solubility of the test substance, or up to a maximum concentration of 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ [26]. No toxicity was observed at any concentration (data not shown), and therefore, the DFDD doses of 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ were used in the muta-

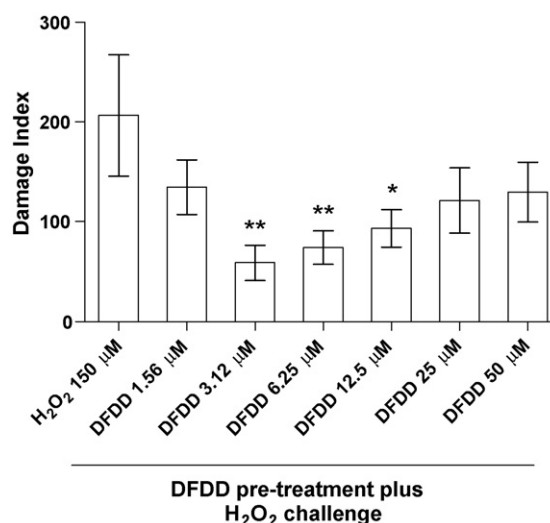


Fig. 4. Protective effect of DFDD from DNA damage induced by H₂O₂ as evaluated by Comet assay. For this purpose, cells were pre-treated with DFDD for 3 h in FBS-free medium, and then exposed to H₂O₂ for 5 min. Bars represent means and standard deviations obtained in an average of 100 cells per experiment—total of four experiments per concentration of each substance. Cells pre-treated with DFDD and exposed to H₂O₂ at 150 μM were compared to cells treated only with the oxidant agent. Data are significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

genic assay. No DFDD mutagenic effects were observed, including at the highest concentration (5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$), neither on TA97a, TA98, TA100, or TA102 in the absence or presence of metabolic activation (Table 1).

DFDD did not cause mutagenicity in the frameshift mutation-detecting strain TA97a when this substance was incubated during growth (Table 2). In addition, DFDD was antimutagenic in all tested concentrations for *S. typhimurium* TA102, inhibiting up to 70% the mutagenicity induced by H₂O₂ (Table 3).

Table 1
Mutagenicity of DFDD in the *Salmonella*/microsome assay.

<i>S. typhimurium</i>		TA98				TA97a			
Substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-S9		+S9		-S9		+S9	
		Rev./plate ^a	MI ^b	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI
NC ^c		24 ± 0.6		25 ± 1		147 ± 29		153 ± 27	
DFDD	1000	22 ± 4	0.9	27 ± 7	1.1	132 ± 27	0.9	155 ± 2	1.0
	2000	21 ± 4	0.9	31 ± 7	1.2	148 ± 25	1.0	182 ± 2	1.2
	3000	20 ± 1	0.8	24 ± 3	1.0	159 ± 6	1.1	195 ± 26	1.3
	4000	29 ± 1	1.2	30 ± 5	1.2	131 ± 26	0.9	165 ± 20	1.1
	5000	24 ± 4	1.0	21 ± 3	0.8	119 ± 21	0.8	179 ± 41	1.2
PC ^d		346 ± 45	14.4	1031 ± 139	41.2	735 ± 195	5.0	709 ± 214	4.6
<i>S. typhimurium</i>		TA100				TA102			
Substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-S9		+S9		-S9		+S9	
		Rev./plate ^a	MI ^b	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI
NC ^c		153 ± 15		134 ± 7		315 ± 45		403 ± 11	
DFDD	1000	117 ± 8	0.8	132 ± 23	1.0	344 ± 51	1.1	374 ± 52	0.9
	2000	123 ± 6	0.8	138 ± 7	1.0	336 ± 15	1.1	381 ± 62	0.9
	3000	108 ± 16	0.7	140 ± 3	1.0	317 ± 35	1.0	416 ± 184	1.0
	4000	131 ± 13	0.9	122 ± 15	0.9	367 ± 28	1.2	325 ± 79	0.8
	5000	128 ± 12	0.8	123 ± 27	0.9	330 ± 15	1.0	349 ± 39	0.9
PC ^d		1175 ± 199	7.7	844 ± 109	6.3	1364 ± 367	4.3	972 ± 233	2.4

^a Number of revertant/plate: mean of three independent experiments ± S.D.

^b Mutagenic Index: no. of *his*⁺ induced in the sample/no. of spontaneous *his*⁺ in the negative control.

^c Negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 μL) used as a solvent for DFDD.

^d Positive control: (-S9) 4-nitroquinoline 1-oxide (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA98, TA97a and TA102 or sodium azide (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA100; (+S9) aflatoxin B1 (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for all strains.

Table 2
Mutagenicity of DFDD in the TA97 strain of *Salmonella*/microsome assay treated during growth in absence of metabolic activation.

Substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Rev./plate ^a	MI ^b
NC ^c		139 \pm 25	
DFDD	1000	139 \pm 23	1.0
	2000	123 \pm 12	0.9
	3000	121 \pm 8	0.9
	4000	125 \pm 8	0.9
	5000	130 \pm 6	0.9
PC ^d		3380 \pm 201	14.6

^a Number of revertants/plate: mean of three independent experiments \pm S.D.

^b Mutagenic Index: no. of *his*⁺ induced in the sample/no. of spontaneous *his*⁺ in the negative control.

^c Negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 μL) used as a solvent for DFDD.

^d Positive control: 4-nitroquinoline 1-oxide (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$).

Table 3
Effects of DFDD on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H_2O_2) in TA102 strain of *Salmonella*/microsome assay.

Substance	Doses ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Rev./plate ^a	I (%) ^b
H_2O_2	100	502 \pm 16	
H_2O_2 + DFDD	100 + 1000	279 \pm 40*	78.0
	100 + 2000	287 \pm 10*	75.1
	100 + 3000	304 \pm 30*	69.0
	100 + 4000	301 \pm 42*	70.1
	100 + 5000	289 \pm 44*	74.5
NC ^c		216 \pm 42*	

^a Number of revertants/plate: mean of three independent experiments \pm S.D.

^b I = % inhibition = $[1 - (B/A)] \times 100$, where A represents the number of revertants on the plate containing mutagen only and B represents the number of revertants on the plate containing mutagen and antimutagen. The number of revertants on the NC plate was subtracted from A and B.

^c Negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 μL) used as a DFDD solvent.

* Significantly different from the positive control group (hydrogen peroxide) at $P \leq 0.05$ /one-way ANOVA–Tukey.

3.4. Mutagenic and antimutagenic effects in *S. cerevisiae*

DFDD at the highest concentration induced a weak cytotoxic effect on XV185-14c *S. cerevisiae* strain during stationary phase of growth (Table 4). Moreover, it did not induce locus non-specific,

Table 4
Induction of point mutation for (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*) and frameshift mutations (*hom3-10*) by DFDD and DFDD plus hydrogen peroxide (H_2O_2) treatments in haploid XV185-14c *Saccharomyces cerevisiae* strain.

Substance	Treatment	Survival (%)	<i>his1/10</i> ⁷ survivors ^a	<i>lys1/10</i> ⁷ survivors ^b	<i>hom3/10</i> ⁷ survivors ^a
NC ^c	0	100.00 \pm 0.00	1.62 \pm 0.03 ^d	1.20 \pm 0.02 ^d	1.81 \pm 0.88 ^d
4-NQO ^e	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	55.50 \pm 2.6	133.32 \pm 7.92*	25.89 \pm 6.71*	14.45 \pm 3.21*
DFDD	40 μM	104.00 \pm 2.29	1.07 \pm 0.60	1.40 \pm 0.40	1.66 \pm 0.30
	80 μM	89.02 \pm 1.50	1.50 \pm 0.10	0.90 \pm 0.60	1.94 \pm 0.07
	120 μM	67.72 \pm 2.73	2.66 \pm 0.20	1.00 \pm 0.40	1.07 \pm 0.01
H_2O_2 ^e	4 mM	22.59 \pm 6.30	16.75 \pm 0.16**	15.0 \pm 0.40**	4.69 \pm 0.27***
DFDD + H_2O_2	40 μM + 4 mM	43.88 \pm 7.68	12.08 \pm 1.20 [#]	0.95 \pm 0.15 [#]	3.84 \pm 0.24 [#]
	80 μM + 4 mM	83.20 \pm 5.09	4.42 \pm 0.10 ^{##}	0.60 \pm 0.17 ^{##}	2.17 \pm 0.60 [#]
	120 μM + 4 mM	98.04 \pm 10.62	2.96 \pm 0.50 ^{##}	0.34 \pm 0.06 ^{##}	1.69 \pm 0.33 [#]

^a Locus-specific revertants.

^b Locus non-specific revertant.

^c Negative control.

^d Mean and standard deviation per three independent experiments.

^e Positive control.

* Significantly different from the negative control group (solvent) at $P \leq 0.001$ /one-way ANOVA–Tukey.

** Significantly different from the negative control group (solvent) at $P \leq 0.01$ /one-way ANOVA–Tukey.

*** Significantly different from the negative control group (solvent) at $P \leq 0.05$ /one-way ANOVA–Tukey.

[#] Significantly different from the positive control group (H_2O_2 4 mM) at $P \leq 0.05$ /one-way ANOVA–Tukey.

^{##} Significantly different from the positive control group (H_2O_2 4 mM) at $P \leq 0.01$ /one-way ANOVA–Tukey.

Table 5
Cat-like activities of DFDD and DPDS.

Substance	Dose (μM)	Cat-like activity (UCat/mg protein) \pm S.D. ^a
DFDD	0	0.00 \pm 0.00
	100	1.88 $\times 10^4 \pm 0.00$ **
	500	4.13 $\times 10^4 \pm 1.59$ **
	2500	19.38 $\times 10^4 \pm 2.65$ **
DPDS	0	0.00 \pm 0.00
	100	0.00 \pm 0.00
	500	0.00 \pm 0.00
	2500	3.75 $\times 10^4 \pm 1.59$ **

^a Standard deviation.

** Significantly different from the negative control group (solvent) at $P \leq 0.01$ /one-way ANOVA–Tukey analysis of variance.

locus-specific, or frameshift mutations in this strain in none of the employed concentrations (Table 4). On the other hand, pre-incubation with DFDD prevented H_2O_2 -induced mutagenesis in that yeast strain. As compared to the H_2O_2 treatment, DFDD treatment enhanced cell survival and decreased mutation frequency at all employed concentrations (Table 4).

3.5. Cat-like and Sod-like assays

DFDD presented significant Cat-like activity at all tested doses (Table 5). However, DPDS showed Cat-like activity only at the highest dose (2500 μM). In addition, both diselenides did not show any Sod-like activities or increased superoxide generation, as measured by adrenochrome formation (data not shown).

3.6. Gas chromatography and mass spectrometry

In order to confirm the stability of the diselenide compounds, DPDS and DFDD were analyzed by GCMS. DPDS and DFDD analyses were conducted immediately and after incubation at 72 h at 37 °C. DPDS and DFDD fragmentation pattern characteristic peaks were obtained at time zero (data not shown). After 72 h of incubation both compounds were detected and were considered stable, since the characteristic peaks of the fragmentation pattern of each molecule were maintained, as demonstrated in Fig. 5A and B. DFDD and DPDS reaction with hydrogen peroxide were then verified. DFDD and DPDS were able to react with H_2O_2 , and the products of

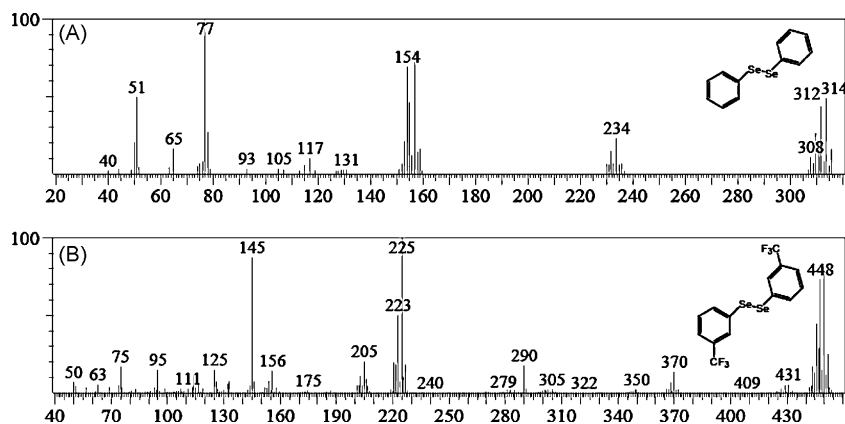


Fig. 5. Evaluation of stability of diselenide compounds, DPDS and DFDD, after 72 h at 37 °C by gas chromatography using EI-mass spectrometer detector. (A) DPDS spectra and (B) DFDD spectra.

these reactions were very different. As shown in Fig. 6A, the reaction of DFDD with H_2O_2 produced three deprotonated molecules: 3-(trifluoromethyl) phenolate ($3\text{-CF}_3\text{PhO}^-$, m/z 161.0265), 3-(trifluoromethyl)phenylseleninate ($m\text{-CF}_3\text{PhSeO}_2^-$, m/z 256.9380) and 3-(trifluoromethyl)phenylselenonate ($3\text{-CF}_3\text{PhSeO}_3^-$, m/z 272.9337). Conversely, the products of the reaction of DPDS with H_2O_2 were two distinct deprotonated molecules, phenylseleninate (PhSeO_2^- , m/z 188.9457) and phenylselenonate (PhSeO_3^- , m/z 204.9402) (Fig. 6B).

4. Discussion

Selenium compounds are considered as “Janus compounds”, i.e., products with a double face, due to their contrasting behavior, which depends on the concentration used. Se in low concentrations may have anticarcinogenic effects, whereas in high concentrations it can be genotoxic and carcinogenic [38,39]. The present study investigated the genotoxic, mutagenic, and protective effects of DFDD using comet assay in V79 mammalian cell line, *Salmonella*/microsome assay and mutagenic assay in *S. cerevisiae*. The results of this study are relevant for the determination of occupational hazards, evaluation of the safety of their possible future pharmacological application, and to explore new biological properties of this compound.

In this study, we demonstrated that DFDD is a weak cytotoxic agent (Fig. 2), and had genotoxic effects on V79 cells at high concentrations, as verified by strand breaks increase in the comet assay (Fig. 3). These results were similar to the genotoxic effects of DPDS on V79 cells, as previously described [11]. In order to further evaluate DNA damage induced by DFDD, we used two mutagenic experimental models: bacteria and yeast. Rosa et al. [10] showed that DPDS induced a high level of frameshift mutation in *S. typhimurium* and in *S. cerevisiae* haploid strain. In contrast, DFDD was not mutagenic for these biological models (Tables 1, 2 and 4).

Taking these data into consideration, we believe that non-mutagenic DFDD properties are linked to the CF_3 groups present in this diselenide (Fig. 1B). Possibly, the fluoro atoms of the CF_3 groups may cause interactions with the DNA molecule, such as hydrogen bonds, which do not allow DFDD intercalation inside the DNA molecule, thereby justifying the absence of frameshift mutagenicity in bacteria and yeast. Another hypothesis is that DFDD could be an indirect genotoxic agent by interacting with non-DNA targets in eukaryotic cells. It is known that organoselenium compounds can directly interact with low molecular thiols, such as reduced glutathione, oxidizing them into disulfides [7]. Moreover, reduced cysteinyl residues from proteins can also react with these compounds, which may cause, in the case of enzymes, loss of

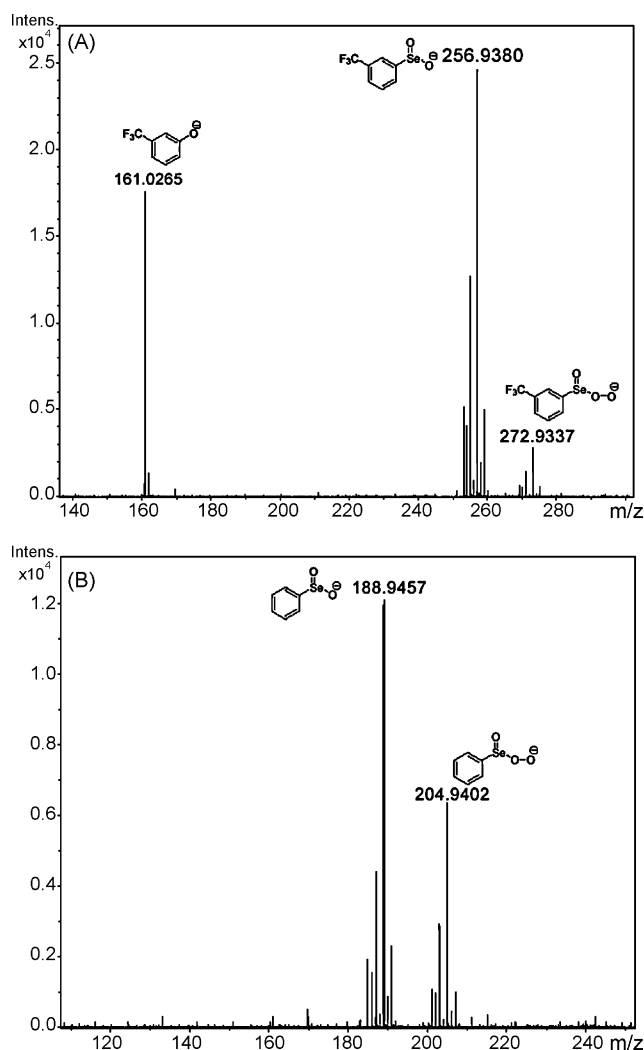


Fig. 6. Electrospray mass spectrometry analysis (ESI-MS) of the reactions of diselenide compounds with hydrogen peroxide. (A) Spectra of the products of the reaction of DFDD with H_2O_2 : m/z 161.026, $3\text{-CF}_3\text{PhO}^-$ (3-(trifluoromethyl)phenolate); m/z 256.9380, $m\text{-CF}_3\text{PhSeO}_2^-$ (3-(trifluoromethyl)phenylseleninate) and m/z 272.9337, $3\text{-CF}_3\text{PhSeO}_3^-$ (3-(trifluoromethyl)phenylselenonate). (B) Spectra of products of the reaction of DPDS with H_2O_2 : m/z 188.9457, PhSeO_2^- (phenylseleninate) and m/z 204.9402, PhSeO_3^- (phenylselenonate).

their catalytic activity [7]. Consistently, several studies showed that selenium compounds may have a direct inhibitory effect on DNA synthesis or repair proteins, and it was suggested that the mechanism of these selenium toxic effects result from its high affinity for non-specific substitution of sulfur in SH-containing proteins [40].

On the other hand, data from our laboratory showed that DPDS genotoxicity is also related to its pro-oxidant activity [8]. Thus, we investigated the action of DFDD against oxidant-induced genotoxicity in the same systems. In V79 cells, both diselenides – only at lower concentrations (3.12–12.5 μM) – were able to protect against the genotoxic effects of hydrogen peroxide (Fig. 4) [13]. As described in previous studies, selenium compounds are considered as products with a double face due to their contrasting behavior, which depends on the concentration used. At low doses, Se has beneficial effects, whereas at high doses, Se can be toxic [6–15]. Nevertheless, in the mutagenesis test with TA102 *S. typhimurium* and XV185-14c *S. cerevisiae* strains (Tables 3 and 4), in contrast with DPDS, which strongly increased mutagenesis induced by H_2O_2 , DFDD did protect against H_2O_2 -induced mutagenicity at all tested concentrations. These findings reinforce the fact that DFDD does not present the pro-oxidant property of its prototype DPDS.

Considering the distinct effects of DFDD and DPDS, mainly relative to H_2O_2 -induced genotoxicity, we evaluated Cat-like and Sod-like activities of these compounds to quickly assess if they specifically acted against H_2O_2 or other reactive oxygen species. As demonstrated in Table 5, DFDD presented Cat-like activity at all tested doses, but DPDS showed Cat-like activity only at the highest dose. Moreover, these diselenides did not present any Sod-like activity (data not shown). These results indicate that both diselenides were able to specifically react with H_2O_2 , but DFDD was more efficient to breakdown H_2O_2 as compared to its analog DPDS. Therefore, Cat-like activity may be the mechanism of the antioxidant effect of DFDD. Several organometallic compounds have been developed as Cat-like agents with potential antioxidant activity, such as manganese (II)-bicarbonate complexes, dimanganese (III) complexes, and iron (III) non-heme molecules [41–44]. This is the first report of an organoselenium compound presenting this property.

It has been proposed that the toxicological properties of DPDS may be related to its oxidation to the extremely reactive compound seleninic acid after reaction with endogenous peroxides [7,45]. In addition, it is known that several organochalcogens present peroxidase-like activity, and, during the catalytic cycle of H_2O_2 reduction, intermediates, such as RSeOH and RSeOOH , are certainly produced and later reduced by thiols to the original compound [46,47]. Therefore, in an attempt to determine the possible products of the reaction of DFDD and DPDS with H_2O_2 , we performed mass spectrometry analysis. As demonstrated in Fig. 6A and B, the reactions of both DFDD and DPDS with H_2O_2 generated two respective phenylseleninate (RPhSeO^-) and phenylselenonate (RPhSeOO^-), and the formation of 3-(trifluoromethyl) phenolate ($m\text{-CF}_3\text{PhO}^-$) was the main difference found in mass spectrum analyses. CF_3 is highly electron-withdrawing group that may induce the hydrolysis of the carbon-selenium bond, producing the observed 3-(trifluoromethyl) phenolate (Fig. 6A). Analyzing the products, 3-(trifluoromethyl)phenylseleninate ($m\text{-CF}_3\text{PhSeO}^-$) is probably the main responsible for the protective effects shown by DFDD. Since fluoro atoms are able to stabilize selenium atoms by intramolecular Se...F non-bonded interaction [48], 3-(trifluoromethyl)phenylseleninic acid may be more stable than the corresponding seleninic acid of DPDS (phenylseleninic acid, PhSeO_2H). Therefore, CF_3 would prevent the selenium atom from rapidly progressing to more advanced oxidation stages, such as occurs with DPDS. Therefore, DFDD may be more efficient than DPDS to reduce H_2O_2 .

In the present study, we showed that some DFDD features are opposite to those observed in DPDS in different assays. Indeed, others studies also reported differences among the properties of these diselenides [7,15,49,50]. Nevertheless, data on the biological activities of selenium compounds containing fluoro or CF_3 moieties are lacking in literature, although important non-selenium molecules presenting this functional group are described. The antitumoral activity of doxorubicin (DOX) derivative 7-O-(2,6-dideoxy-6,6,6-trifluoro- α -L-lyxo-hexopyranosyl) adriamycinone was stronger than DOX against murine leukemia L1210 *in vivo* at a low dose range. In fact, the authors reported that this better antitumoral activity was attributed to presence of the strong electron-withdrawing CF_3 , which may stabilize the DOX-derivative compound [51]. Moreover, Miri et al. [52] studied the structure-activity relationship of antitumoral diindenopyridine derivatives containing electron-withdrawing groups, such as $-\text{F}$ and $-\text{NO}_2$, or electron-donating groups, such as $\text{N}(\text{CH}_3)$, in various tumoral cell lines. Those authors reported that electron-withdrawing groups increase the activity of the compounds, and derivatives containing mainly fluoro-phenyl moieties were those with the highest cytotoxic activity [50]. Taking this information into consideration, we also suppose that CF_3 functional groups present in DFDD make the molecule most stable, and therefore, they may be responsible for the distinct activities of DFDD and its structural analog DPDS.

The present article clearly demonstrated that the new organoselenium compound DFDD is an interesting molecule due to its antioxidant and antimutagenic effects. This is the first study that demonstrates that DFDD is capable of protecting bacteria, yeast, and cultured mammalian cells against H_2O_2 -induced mutagenesis and genotoxicity, and that the mechanism involved in this property is probably the Cat-like activity of DFDD.

These results warrant further studies to characterize the modulatory chemopreventive effects of DFDD against the action of others mutagens, as well as to investigate the pharmacological potential of this interesting molecule.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest involved in this study.

Acknowledgments

The authors thank Mr. José Carlos Tomaz (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for his technical assistance. This work was supported by the following Brazilian agencies: CNPq, FAPERGS and Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação tecnológica – ROYAL/Centro de Biotecnologia/UFRGS.

References

- [1] L. Schomburg, U. Schweizer, J. Kohrle, Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1988–1995.
- [2] G.V. Kryukov, R.A. Kumar, A. Koc, Z. Sun, V.N. Gladyshev, Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 4245–4250.
- [3] Y. Saito, K. Takahashi, Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5746–5751.
- [4] A.U. Brauer, N.E. Savaskan, Molecular actions of selenium in the brain: neuro-protective mechanisms of an essential trace element, *Rev. Neurosci.* 15 (2004) 19–32.
- [5] L.V. Papp, J. Lu, A. Holmgren, K.K. Khanna, From selenium to selenoproteínas: synthesis, identify, and their role in human health, *Antioxid. Redox Signal.* 9 (7) (2007) 775–806.
- [6] G. Muges, W. du Mont, H. Sies, Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2125–2179.
- [7] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 255–285.

- [8] R.M. Rosa, R. Roesler, A.L. Braga, J. Saffi, J.A.P. Henriques, Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (2007) 1287–1304.
- [9] S.N. Weis, A.M. Favero, E.C. Stangherlin, F.G. Manarin, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development, *Reprod. Toxicol.* 23 (2006) 175–181.
- [10] R.M. Rosa, K. Sulzbacher, J.N. Picada, R. Roesler, J. Saffi, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 563 (2004) 107–115.
- [11] R.M. Rosa, J.N. Picada, J. Saffi, J.A.P. Henriques, Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts, *Mutat. Res.* 628 (2007) 87–98.
- [12] R.M. Rosa, N.C. Hoch, G.V. Furtado, J. Saffi, J.A.P. Henriques, DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide, *Mutat. Res.* 633 (2007) 35–45.
- [13] R.M. Rosa, D.J. Moura, A.C.R. Silva, J. Saffi, J.A.P. Henriques, Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells, *Mutat. Res.* 631 (2007) 44–54.
- [14] C.W. Nogueira, F.C. Meotti, E. Curte, C. Pilissão, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats, *Toxicology* 183 (2003) 29–37.
- [15] F.C. Meotti, E.C. Stangherlin, G. Zeni, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation, *Environ. Res.* 94 (2004) 276–282.
- [16] M.S. Machado, R.M. Rosa, A.S. Dantas, G.K. Reolon, H.R. Appelt, A.L. Braga, J.A.P. Henriques, R. Roesler, An organic selenium compound blocks apomorphine-induced stereotypy in mice, *Neurosci. Lett.* 410 (2006) 198–202.
- [17] A.L. Braga, A. Reckziegel, P.H. Menezes, H.A. Stefani, Alkynyl sulfides and selenides from alkynyl bromides and diorganoyl chalcogenides promoted by copper (I) iodide, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 393–394.
- [18] A.L. Braga, C.C. Silveira, A. Reckziegel, P.H. Menezes, Convenient preparation of alkynyl selenides, sulfides and tellurides from terminal alkynes and phenylchalcogenyl halides in the presence of copper (I) iodide, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 8041–8042.
- [19] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–251.
- [20] D.P. Bezerra, D.J. Moura, R.M. Rosa, M.C. Vasconcellos, A.C.R. Silva, M.O. Moraes, E.R. Silveira, M.A.S. Lima, J.A.P. Henriques, L.V. Costa-Lotufo, J. Saffi, Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells, *Mutat. Res.* 652 (2008) 164–174.
- [21] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [22] A. Hartman, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- [23] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [24] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay (single cell gel test)—a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, NJ7 Humana Press, Totowa, 1999, pp. 203–212.
- [25] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29–60.
- [26] OECD Guideline for Testing of Chemicals 471, Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.
- [27] D.E. Levin, M. Hollstein, M.F. Christman, E.A. Schwiers, B.N. Ames, A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pair at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (1982) 7445–7449.
- [28] S. Snow, Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast, *Mol. Gen. Genet.* 164 (1978) 341–342.
- [29] D.C. Hawthorne, Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71–75.
- [30] R.C. Von Borstel, K.T. Cain, C.M. Steinberg, Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17–27.
- [31] R.C. Schuller, R.C. Von Borstel, Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17–23.
- [32] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [33] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [34] L.N. Myers, L. Adams, T.K. Kier, B. Rao, B. Shaw, L. Williams, Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/*Salmonella* test, in: D. Krewshi (Ed.), *Statistical Methods in Toxicological Research*, Gordon and Brech, New York, 1991.
- [35] G. Cabrera, Effect of five dietary antimutagens on the genotoxicity of six mutagens in the Microscreen Phage-induction assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (2000) 206–220.
- [36] A. Camussi, F. Moller, M. Ottaviano, S. Gorla, Distribuizione campionarie e stima dei parametri in una popolazione, Zanichelli, Bologna, 1986.
- [37] A.R. Collins, Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay, *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* 681 (2009) 24–31.
- [38] R.A. Santos, C.S. Takahashi, Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 671–677.
- [39] R.C. Von Borstel, J.A. Higgins, Janus carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.* 402 (1998) 321–329.
- [40] K.S. Abul-Hassan, B.E. Lehnert, L. Guant, R. Walmsley, Abnormal DNA repair in selenium-treated human cells, *Mutat. Res.* 565 (2004) 45–51.
- [41] J. Paschke, M. Kirsch, H.G. Korth, H. de Groot, R. Sustmann, Catalase-like activity of a non-heme dibenzotetraaza[14]annulene-Fe(III) complex under physiological conditions, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11099–11100.
- [42] D. Moreno, C. Palopoli, V. Daier, S. Shova, L. Vendier, M.G. Sierra, J.P. Tuchagues, S. Signorella, Synthesis, structure and catalase-like activity of dimanganese(III) complexes of 1,5 bis(X-salicylidenamino)pentan-3-ol (X = 3- and 5-methyl), Influence of phenyl-ring substituents on catalytic activity, *Dalton Trans.* 21 (2006) 5156–5166.
- [43] K.G. Tikhonov, O.M. Zastrizhnaya, Y.N. Kozlov, V.V. Klimov, Composition and catalase-like activity of Mn(II)–bicarbonate complexes, *Biochemistry (Mosc)* 13 (2006) 1270–1277.
- [44] W. Sicking, H.G. Korth, G. Jansen, H. de Groot, R. Sustmann, Hydrogen peroxide decomposition by a non-heme iron (III) catalase mimic: a DFT study, *Chemistry* 13 (2007) 4230–4245.
- [45] M. Farina, N.B.V. Barbosa, C.W. Nogueira, V. Folmer, G. Zeni, L.H. Andrade, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase dehydratase from rat liver and cucumber leaves, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 623–631.
- [46] H.E. Ganther, R.J. Kraus, Oxidation states of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 107 (1984) 593–602.
- [47] F. Ursini, A. Bindoli, The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes, *Chem. Phys. Lipids* 44 (1987) 255–276.
- [48] M. Iwaoka, H. Komatsu, T. Katsuda, S. Tomoda, Quantitative evaluation of weak nonbonded Se . . . F interactions and their remarkable nature as orbital, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 1902–1909.
- [49] S.N. Weis, S.S. Roman, C.W. Nogueira, Toxicity of 3′3′-ditrifluoromethylphenyl diselenide administered during intra-uterine development of rats, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3640–3645.
- [50] E.A. Wilhelm, C.R. Jesse, C.W. Nogueira, L. Savegnago, Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats, *Exp. Toxicol. Pathol.* (in press).
- [51] Y. Takagi, K. Nakai, T. Tsuchiya, T. Takeuchi, A 5′-(trifluoromethyl)anthracycline glycoside: synthesis of antitumor-active 7-O-(2,6-dideoxy-6,6,6-trifluoro-r-l-lyxo-hexopyranosyl) adriamycinone, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 1582–1588.
- [52] R. Miri, K. Javidnia, B. Hemmateenejad, A. Azarpira, Z. Amirghofran, Synthesis, cytotoxicity, QSAR, and intercalation study of new diindenopyridine derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2529–2536.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS ADICIONAIS

4. RESULTADOS ADICIONAIS

Neste Capítulo, serão ilustrados os resultados gerados nesta tese que não estão incluídos nos Capítulos anteriores. No entanto, como estes resultados são importantes para a discussão do presente trabalho, os mesmos serão apresentados juntamente com as metodologias neste Capítulo.

Além dos resultados apresentados nos Capítulos I e II, os estudos realizados com os novos agentes Zalypsis e Tryptamicidin geraram interessantes resultados sobre os mecanismos de ação desses agentes. Utilizando linhagens tumorais, foi possível verificar que ambos os compostos apresentam potente atividade citotóxica apresentando valores de IC₅₀ na faixa nanomolar. Adicionalmente, o Tryptamicidin, assim como a trabectedina e o Zalypsis, leva à formação de quebras duplas no DNA (DSB). Considerando estas observações, investigou-se o envolvimento dos sistemas de reparação por recombinação homóloga (HRR) e não-homóloga (NHEJ), os quais são implicados na reparação de DSB. Linhagens celulares proficientes e deficientes em enzimas do HRR e do NHEJ foram expostas aos agentes e, pela avaliação da viabilidade, foi possível verificar que as células deficientes em HRR foram altamente sensíveis ao Zalypsis e Tryptamicidin, salientando a importância desta via na reparação das lesões induzidas por esses agentes alquilantes.

Neste trabalho, a atividade do Zalypsis também foi analisada na resposta a danos no DNA (*DNA damage response*), também chamada de *checkpoint*. Utilizando imunocitoquímica, detectou-se que o Zalypsis não foi capaz de ativar as vias de *checkpoint* controladas pelas cinases ATM ou ATR

em células tumorais. Resultados similares foram observados em extratos de *Xenopus laevis*, onde o Zalypsis não induziu o recrutamento de RPA à cromatina. Destaca-se que neste modelo biológico também foi possível demonstrar que o Zalypsis induziu o bloqueio da replicação, corroborando com os resultados obtidos em linhagens tumorais como apresentado no Capítulo I.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Reagentes e células

Os agentes antitumorais Zalypsis®, Tryptamicidin® e trabectedina foram fornecidos pela empresa PharmaMar (Madri, Espanha). O derivado da acrocina S23906 foi obtido do *Institut de Recherche Servier* (Croissy sur Seine, França). O metabólito ativo da camptotecina SN-38 foi adquirido da empresa Abatraz Technology (Xi'na, China). O sulfato de bleomicina, o 5-fluorouracila e o reagente MTT foram comprados da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, França). As agaroses normal e *low melting point* foram adquiridas da InVitrogen (Cergy-Pontoise, França). Inibidores de proteases foram adquiridos da empresa Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha). Os linfócitos foram isolados pela centrifugação em Ficoll do sangue total de doadores saudáveis. As células HeLa – M de carcinoma de cervix foram doadas pelo Dr. Andrzej Skladanowski (Gdansk, Polônia). As células IGROV₁ e A2780 de carcinoma de ovário foram doadas pelos pesquisadores Dr. Alain Pierré, (Croissy sur Seine, França) e Dr. Robert Brown (Biarritz, Inglaterra). As células de carcinoma de colon HCT-116 foram doadas pelo Dr. Bert Vogelstein (Baltimore, USA). As linhagens proficientes e deficientes em recombinação homóloga e não-homóloga, foram doadas pela Dra. Malgorzata Zdzienicka (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). As linhagens proficientes incluem a V79B (fibroblasto de pulmão de hamster chinês) e a AA8 (células de ovário de hamster chinês) enquanto as deficientes são as linhagens deficientes em HRR CIV4B (RAD51^{-/-}) e IrS-1SF (XRCC3^{-/-}) e a linhagem deficiente em NHEJ XRV-15B (KU80/XRCC5^{-/-}) (Soares *et al.*, 2007). Os linfócitos isolados e as células

A2780 e IGROv1 foram mantidas em meio RPMI-1640. As linhagens HeLa-M e V79B foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium). As células HCT-116 foram mantidas em meio McCoy's 5A. Todos os meios de cultura foram adquiridos da empresa Invitrogen (Cergy-Pontoise, França) e foram suplementados com 5 % de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamine (Eurobio, Les Ulis, França), 100 units/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (PanPharma, Fougères, França). Todas as linhagens foram regularmente testadas quanto à presença de micoplasma utilizando o Mycoplasma Detection Kit Myco Alert® (Catalog # LT07-318, Lonza, Basel, Suíça). Os anticorpos primários anti-pSer1981-ATM, anti-RPA70 e anti-pSer317-Chk1 foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Os anticorpos secundários correspondentes foram adquiridos da Jackson ImmunoResearch (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Os anticorpos específicos para *Xenopus sp* anti-MCM3, anti-RPA32 e anti-H3 foram sintetizados conforme descrito em Maiorano e colaboradores (2005). Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico.

4.1.2 Ensaios de Citotoxicidade

A viabilidade das linhagens celulares expostas ao Zalypsis, Tryptamicidin e trabectedina foi avaliada pelo Ensaio de Redução de MTT (Poindessous *et al.*, 2003). Basicamente, 7×10^3 células foram semeadas em cada poço, em uma placa de 24 poços e incubadas a 37 % e 5 % de CO₂. Após 24 horas, as células foram expostas aos agentes durante 1 hora e lavadas em PBS. As células foram então reincubadas em meio de cultura a 37 % e 5 % de CO₂ durante quatro dias. No final deste período, foi adicionado

uma solução do corante MTT e as células permaneceram a 37 % e 5 % de CO₂ por adicionais 3 a 4 horas para permitir a entrada do corante nas células e redução do MTT a formazan pela mitocôndria das células viáveis. Após, o meio de cultura foi aspirado e o formazan resultante foi dissolvido em DMSO e analisado em um espectrofotômetro de microplacas a 540 nm. O controle negativo foi considerado como 100 % de viabilidade e as concentrações de cada agente foi comparado com o este. Os resultados apresentados nas figuras 8, 9 e 10 correspondem à média de três experimentos independentes feitos em duplicata.

4.1.3 Ensaio Cometa

As atividades genotóxicas dos compostos Zalypsis, Tryptamicidin e trabectedina foram avaliadas pelo ensaio cometa nas versões alcalina e neutra (Olive & Banáth, 2006, Speit *et al.*, 2007). As células V79B ou os linfócitos isolados foram expostos por 1 hora aos agentes e imediatamente processadas para a preparação de lâminas. Para isso, as células V79B e os linfócitos foram semeados na quantidade de 1×10^5 células por poço, em uma placa de 6 poços. Ambas as células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 horas e, então, expostas aos agentes por 1 hora. Após os tratamentos, as células V79B foram lavadas em PBS, centrifugadas e ressuspensas em PBS. Após, a suspensão celular foi misturada em agarose L.M.P. (0,75 %) e espalhadas sobre uma lâmina de microscopia contendo uma camada de agarose normal (1,5 %). Após a solidificação da agarose, as lâminas foram incubadas por 1 hora a 4 °C em solução de lise pH 8 (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, L-laurilsarcosinato 1 %, Triton X100 0,5 %, DMSO 10 %). Para a realização da

versão neutra, as lâminas foram submetidas à eletroforese por 1 hora a 4 °C a 25 V e 11 mA em tampão TBE pH 8,3. Para a realização da versão alcalina, após a lise as lâminas foram incubadas por 20 minutos na solução alcalina (NaOH 10 M e EDTA 200 mM) e submetidas à eletroforese na mesma solução por 20 minutos a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram incubadas com a solução neutralizadora (Tris 0,4 M) e fixadas em etanol por 10 minutos. Para a análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio e as células foram analisadas em microscópio de fluorescência. A quantificação da fluorescência presente na cauda do cometa de cada célula foi realizada pelo software Komet 5.5. Os tratamentos foram feitos em duplicata e no mínimo 200 células foram analisadas por amostra. Os gráficos apresentam a média das percentagens de no mínimo dois experimentos independentes.

4.1.4 Ensaio de Imunocitoquímica

As células, na quantidade de 1×10^5 por poço, foram semeadas em placas para cultura de células de 6 poços contendo uma lamínula em cada poço. Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, as células foram expostas por 1 hora aos agentes. Após o tratamento, as células foram pré-incubadas por 5 minutos a 4 °C com o tampão de lise CSK (NaCl 150 mM, MgCl₂, Triton X100 1 %, HEPES 50 mM pH 7.4, sacarose 30 mM e inibidores de proteases) e/ou lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído 4 % e permeabilizadas em Triton X100 0,5 %. Após saturação com BSA 3 %, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários anti-pSer1981-ATM, anti-RPA70 e anti-pSer317-Chk1 (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, França) por 1 hora. Após lavagem em tampão, as células

foram incubadas com os anticorpos secundários correspondentes (Jackson Immunoresearch, BarHarbor, USA). A marcação do DNA e a montagem das lâminas foram realizadas com Vectashield contendo DAPI (Vectashield, Vector). As imagens foram analisadas em microscópio de fluorescência e as intensidades de fluorescência de cada célula foram analisadas pelo software MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA). No mínimo 200 células foram analisadas por amostra e os valores representam as médias de dois experimentos independentes.

4.1.5 Cinética de replicação em *Xenopus laevis*

Os experimentos em *Xenopus laevis* foram realizados conforme descrito (Lutzmann & Méchali, 2008). Basicamente, os extratos de oócitos foram suplementados com um mix energético (creatina cinase 10 mg/mL, fosfato de creatina 10 mM, ATP 1 mM e MgCl₂ 1 mM) e incubados com o DNA do esperma, α (P³²)dCTP (3000 Ci/mmol) e com o Zalypsis a 37 °C. Nos períodos indicados, pequenas alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à cinética de replicação quantificada pela incorporação do nucleotídeo radioativo no DNA replicado, sendo as percentagens calculadas em relação ao controle negativo. Quando indicado, o inibidor de replicação afidicolina 50 μ M foi adicionado 10 minutos antes do início da reação.

4.1.6 Imunocitoquímica em extratos de *Xenopus laevis*

Para a análise da cromatina, a reação de replicação foi preparada como descrito anteriormente, com a exceção do nucleotídeo radioativo que não foi

adicionado. Neste experimento, o Zalypsis foi adicionado ao extrato no momento inicial da reação. Após incubações de 10, 35 e 60 minutos, os extratos foram processados para imunofluorescência conforme descrito por Maiorano e colaboradores (2005). Primeiramente, os extratos foram diluídos e fixados em tampão XB (HEPES-KOP 10 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM, 5 % de sacarose) + paraformaldeído 4 % por 15 minutos. Os núcleos fixados foram transferidos para lamínulas por centrifugação e pós-fixados em etanol 100 % por 20 minutos a 4 °C. As amostras foram reidratadas em PBS e incubadas com uma solução de DIOC 0,5 µg/mL (Sigma-Aldrich). A análise dos núcleos foi realizada em microscópio de fluorescência.

4.1.7 Western blot

As reações de replicação foram preparadas conforme descrito anteriormente, com a exceção do nucleotídeo radioativo que não foi adicionado. Neste experimento, os extratos foram pré-incubados por 10 minutos com afidicolina 50 µM e após 45 minutos do início da reação de replicação, o Zalypsis foi adicionado e nos períodos indicados, as amostras foram processadas para o ensaio western blot. Para o isolamento da cromatina, a reação de replicação foi diluída 5 x em tampão XB + Triton X100 3 % e mantida a 4 °C por 5 minutos. Após, a amostra foi adicionada em sacarose 0,7 M e a cromatina foi isolada por centrifugação (6000 g, 5 minutos, 4 °C). Para o isolamento dos núcleos, a reação de replicação foi diluída 5 x em tampão XB e incubada a 4 °C por 2 minutos. Após, os núcleos foram isolados por centrifugação em gradiente de sacarose como descrito acima. O ensaio Western Blot foi realizado conforme descrito em Lutzmann & Méchali (2008).

4.2 Resultados

4.2.1 Ensaio de Redução de MTT

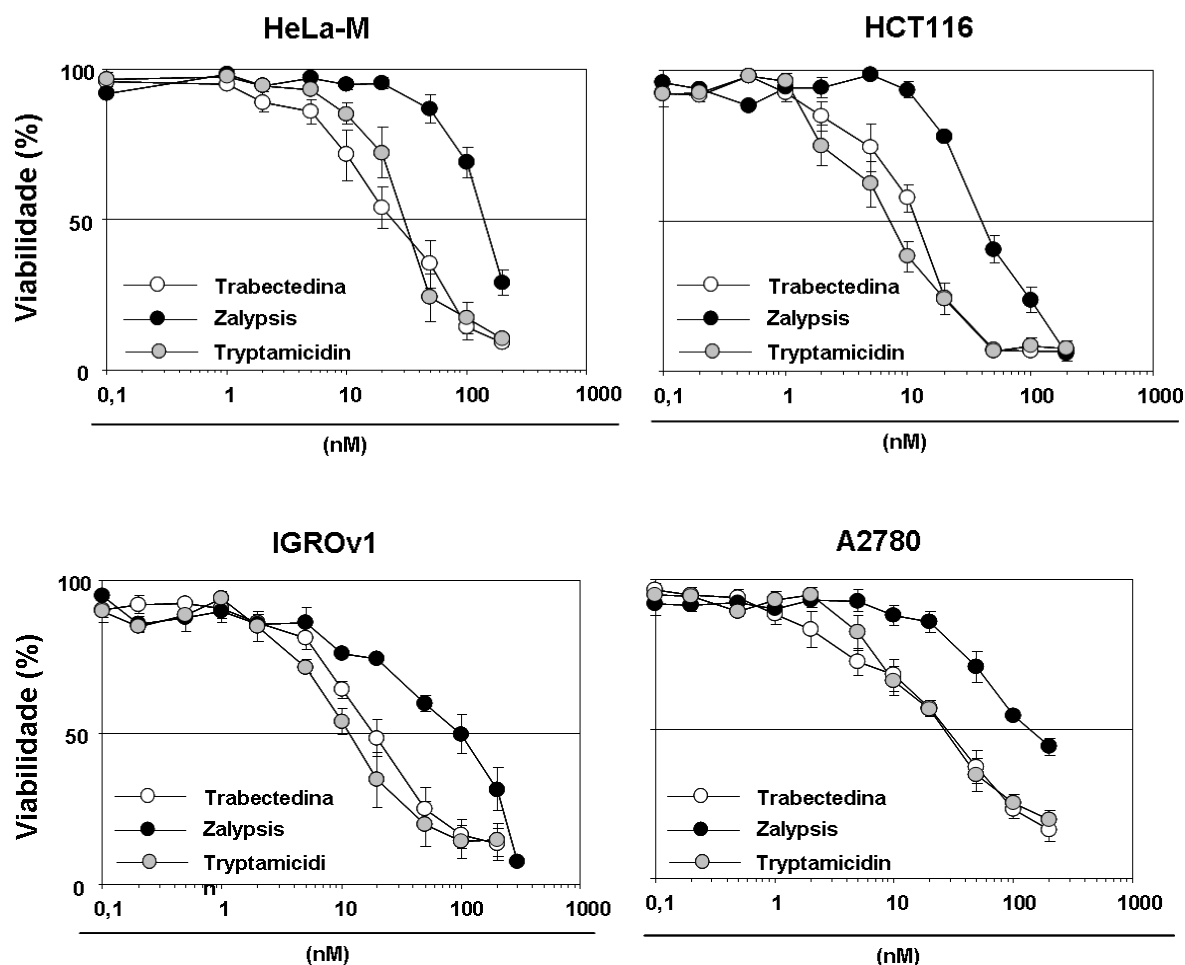


Figura 8. Atividades citotóxicas da trabectedina, Zalypsis e Tryptamicidin em diferentes células tumorais. As linhagens tumorais de cérvix (HeLa-M), colon e reto (HCT116) e ovário (IGROv1 e A2780) foram expostas aos agentes por uma hora seguida da pós-incubação em meio de cultura por aproximadamente quatro gerações. A análise da viabilidade foi realizada pelo ensaio de Redução de MTT. Os valores representam a média de três experimentos independentes, feitos em duplicata.

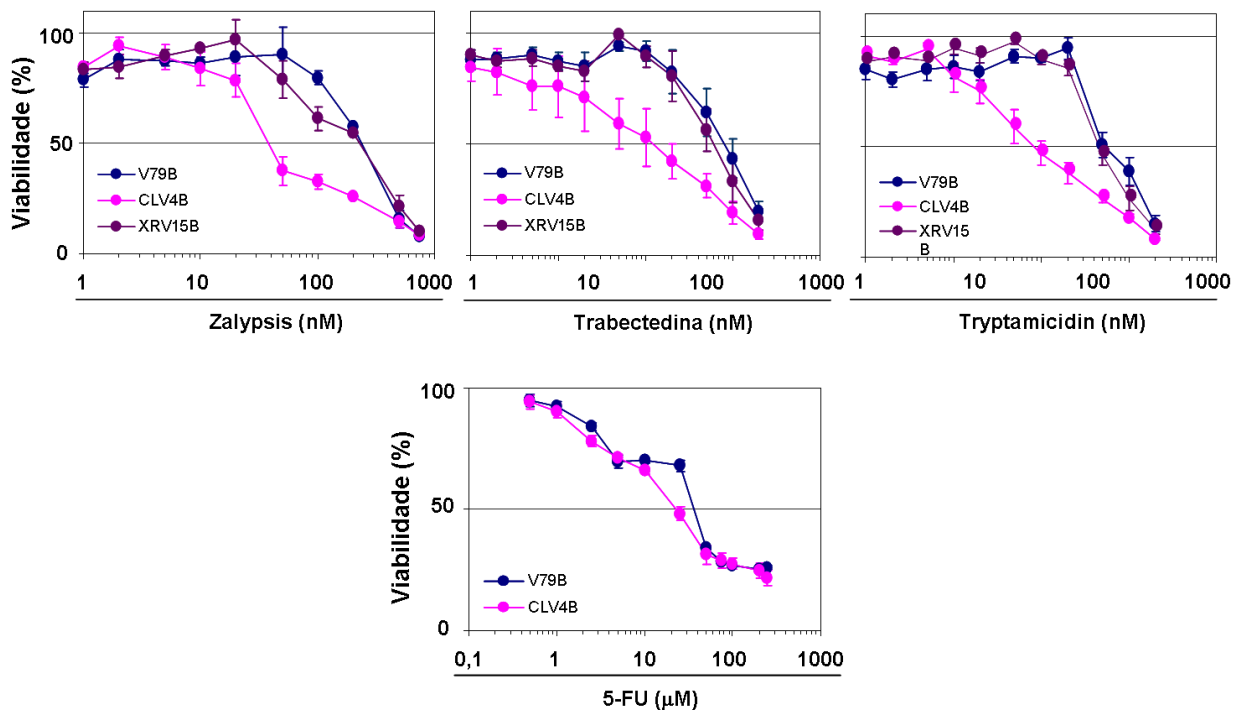


Figura 9. Atividades citotóxicas da trabectedina, Zalyphis e Tryptamicidin em células proficientes ou deficientes no sistema de reparação por recombinação homóloga e não-homóloga. As linhagens de fibroblastos de hamster chinês V79B (WT), CIV4B (RAD51^{-/-}) e XRV-15B (KU80^{-/-}) foram expostas aos agentes por uma hora seguida da pós-incubação em meio de cultura por aproximadamente quatro gerações. Neste experimento, também foi utilizado o agente antitumoral 5-fluorouracila como controle negativo da via de reparação. A análise da viabilidade foi realizada pelo ensaio de Redução de MTT. Os valores representam a média de no mínimo três experimentos independentes, feitos em duplicata.

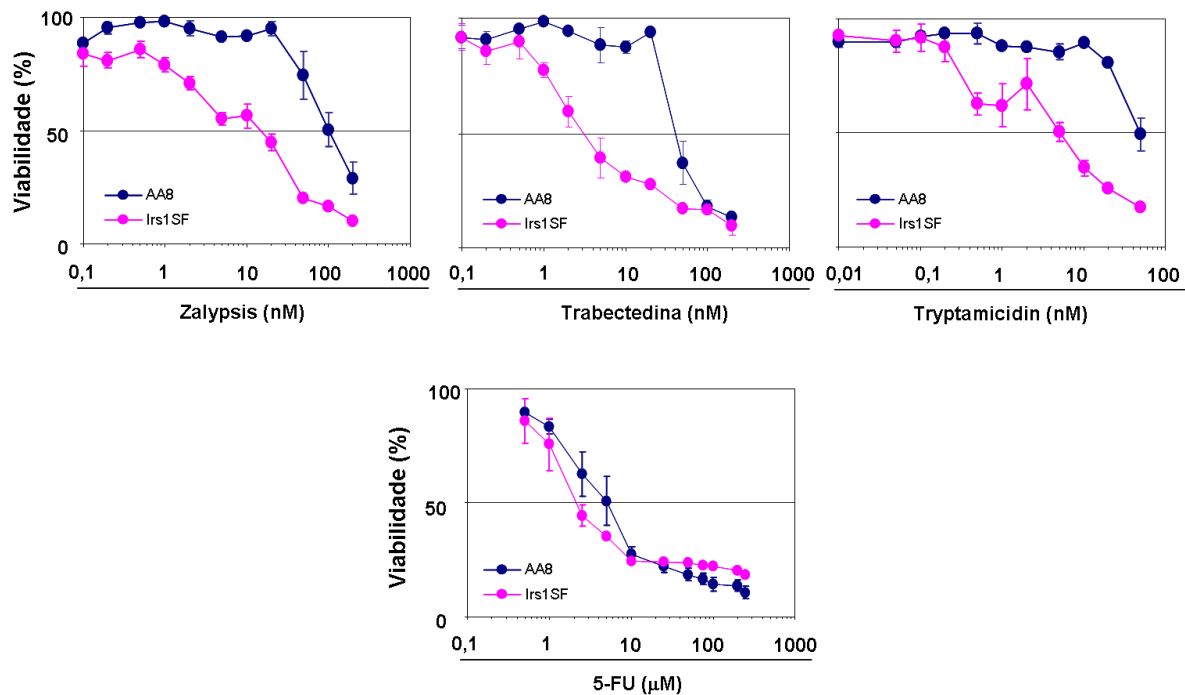
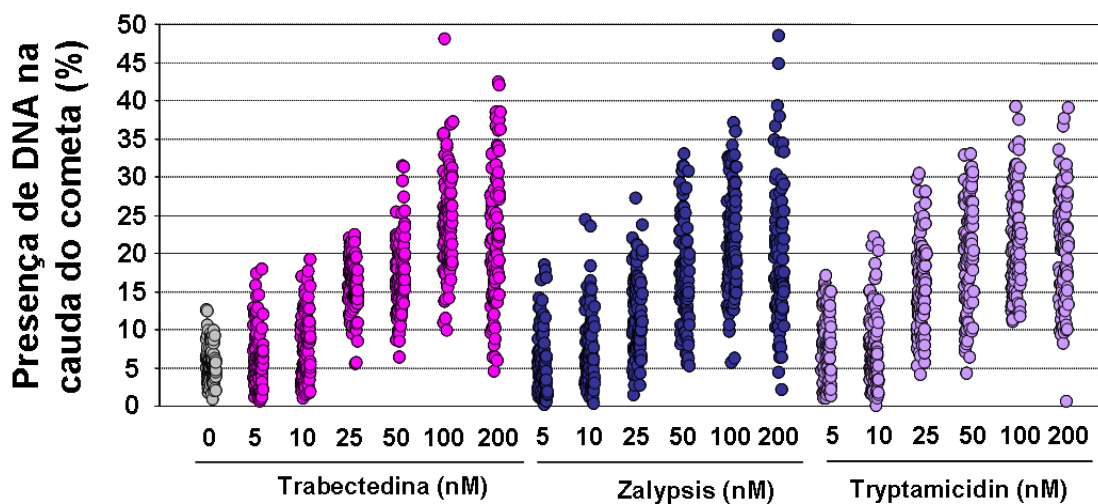


Figura 10. Atividades citotóxicas da trabectedina, Zalypsis e Tryptamicidin em células proficientes ou deficientes no sistema de reparação por recombinação homóloga. As linhagens de hamster chinês AA8 (WT) e Irs1SF (XRCC3^{-/-}) foram expostas aos agentes por uma hora seguida da pós-incubação em meio de cultura por aproximadamente quatro gerações. Neste experimento, também foi utilizado o agente antitumoral 5-fluorouracila como controle negativo da via de reparação. A análise da viabilidade foi realizada pelo ensaio de Redução de MTT. Os valores representam a média de no mínimo três experimentos independentes, feitos em duplicata.

4.2.2 Ensaio Cometa

A



B

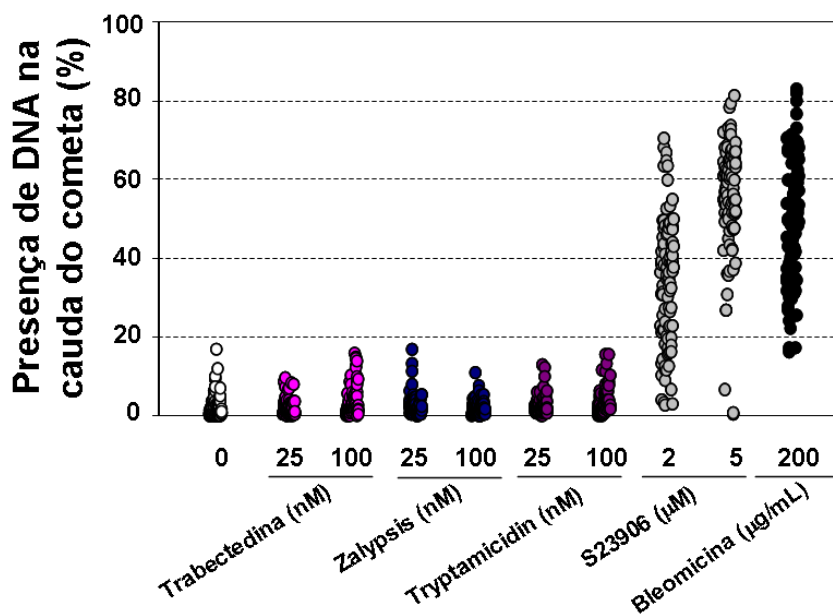


Figura 11. Indução de quebras no DNA pelos compostos trabectedina, Zalypsis e Tryptamicidin em diferentes linhagens celulares. As células V79B (A) ou linfócitos (B) foram expostas aos agentes por uma hora e foram processadas para o ensaio cometa neutro e alcalino. Para a análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio e as células por analisadas em microscópio de fluorescência. A quantificação da fluorescência presente na

cauda do cometa de cada célula foi realizada pelo software Komet 5.5. Os tratamentos foram feitos em duplicata e no mínimo 200 células foram analisadas por amostra. Os gráficos apresentam a média das percentagens de no mínimo dois experimentos independentes.

4.2.3 Cinética de replicação em extratos de *Xenopus laevis*

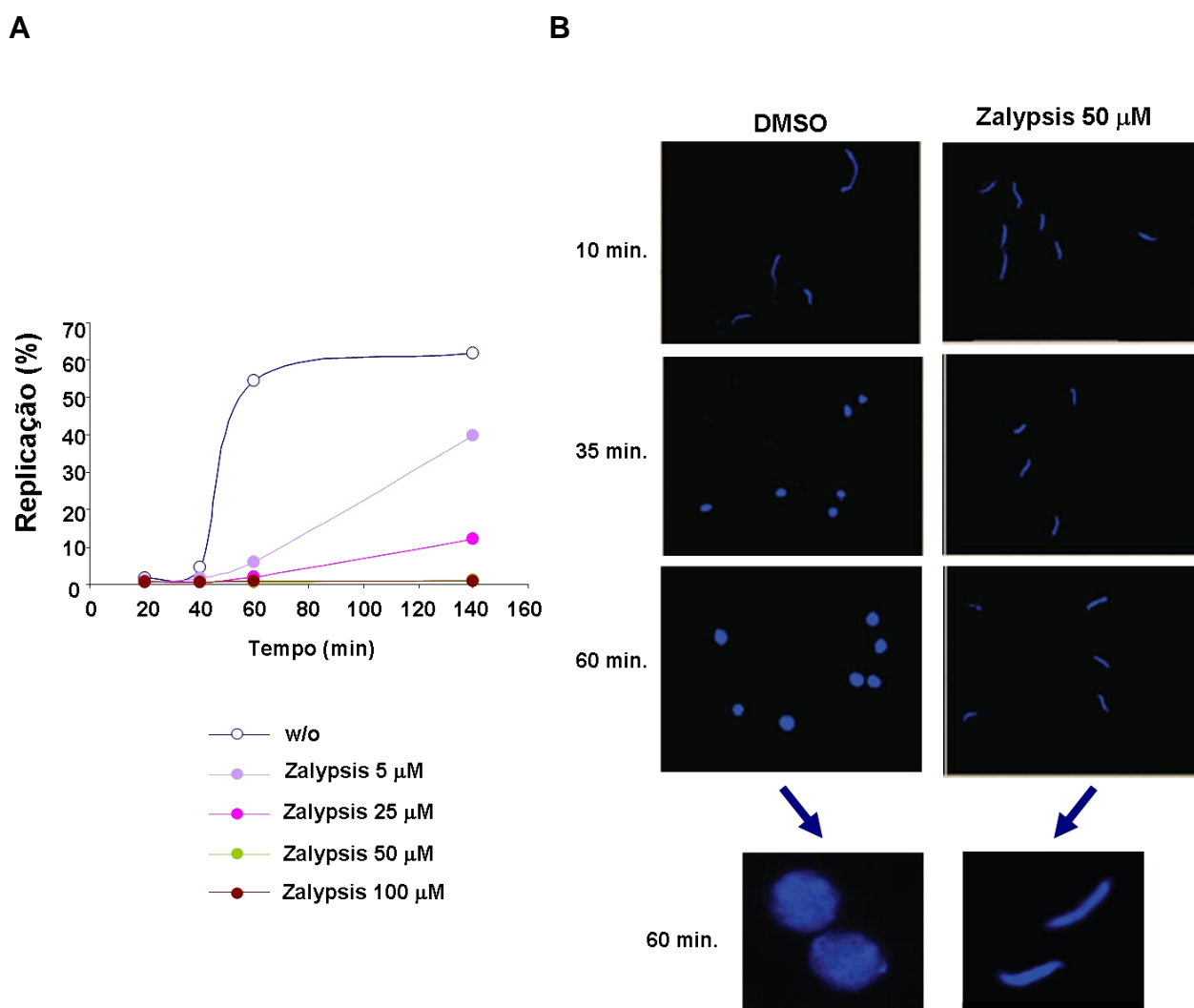


Figura 12. Inibição da replicação e da descondensação da cromatina pelo Zalypsis. Para a reação de replicação, os extratos de oócitos foram suplementados com um mix energético (creatina, ATP e $MgCl_2$) e incubados com o esperma, $\alpha(P^{32})dCTP$ (3000 Ci/mmol) e com o Zalypsis a 37 °C por 140 minutos. Nos períodos indicados, pequenas alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à **(A)** cinética de replicação quantificada pela incorporação do nucleotídeo radioativo no DNA replicado, sendo as percentagens calculadas em relação ao controle negativo, e **(B)** morfologia dos núcleos analisada pela marcação com DIOC em microscópio de fluorescência (objetiva 40 x).

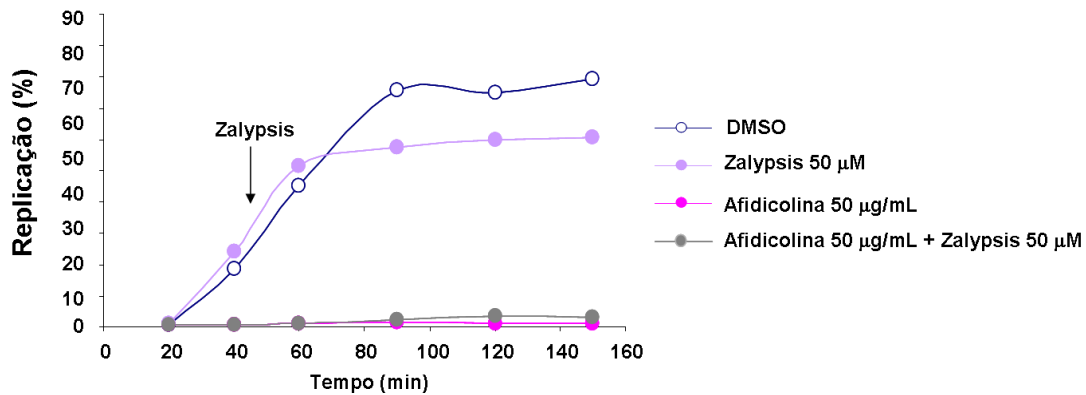
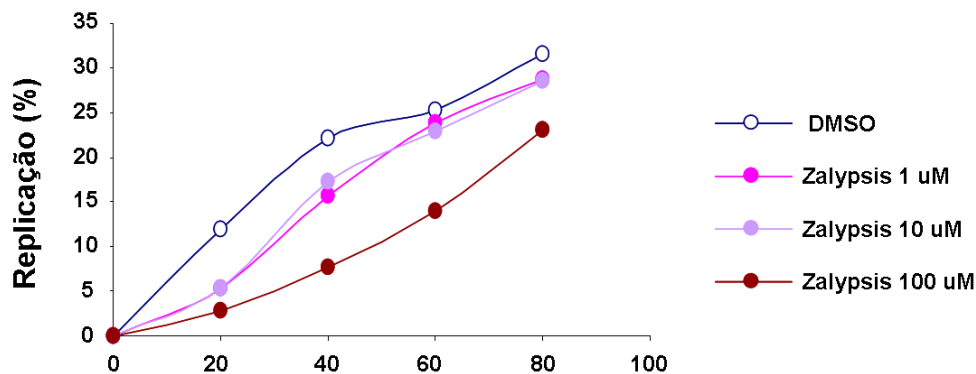
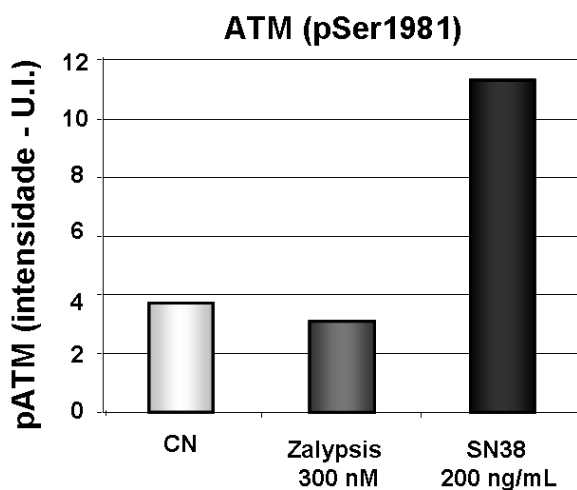
A**B**

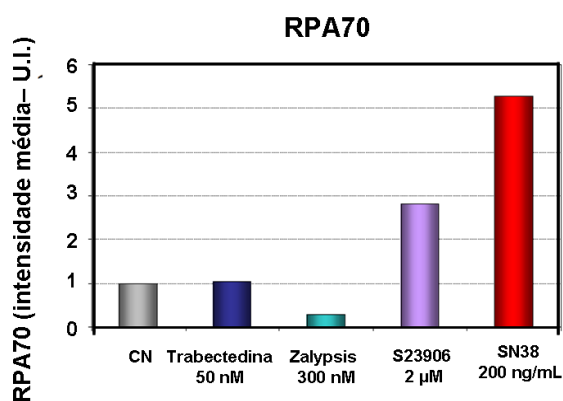
Figura 13. Inibição da replicação e da descondensação da cromatina pelo Zalypsis. (A) Extratos de oócitos foram suplementados com um mix energético (creatina, ATP e $MgCl_2$) e incubados com o esperma e $\alpha(P^{32})dCTP$ (3000 Ci/mmol) a 37 °C. Após 45 minutos, o Zalypsis foi adicionado e nos períodos indicados, pequenas alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à incorporação do nucleotídeo radiotivo. (B) Extratos de oócitos foram suplementados com um mix energético (creatina, ATP e $MgCl_2$) e incubados com ssDNA (Kit), $\alpha(P^{32})dCTP$ (3000 Ci/mmol) e com o Zalypsis a 37 °C.

4.2.4 Imunocitoquímica na linhagem HeLa-M

A



B



C

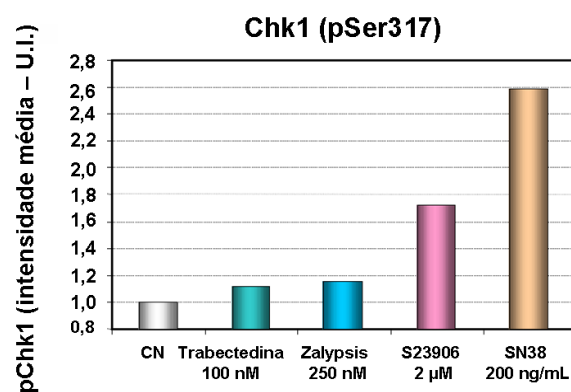


Figura 14. Ativação das enzimas ATM, RPA70 e CHK1 em células HeLa-M expostas ao Zalypsis. As células foram crescidas sobre lamínulas e após 24 horas foram expostas ao Zalypsis por uma hora. Após o tratamento, as células foram pré-incubadas por 5 minutos a 4 °C com o tampão de lise CSK (NaCl 150 mM, MgCl₂, Triton X100 1 %, HEPES 50 mM pH 7.4, sucrose 30 mM e inibidores de proteases) e/ou lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído 4 % e permeabilizadas em Triton X100 0,5 %. Após saturação com BSA 3 %, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários **(A)** anti-pSer1981-ATM, **(B)** anti-RPA70 e **(C)** anti-pSer317-Chk1(Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) e com os anticorpos secundários correspondentes (Jackson Immunoresearch, BarHarbor, ME). A marcação do

DNA e a montagem das lâminas foram realizadas com Vectashield contendo DAPI (Vectashield, Vector). As imagens foram analisadas em microscópio de fluorescência e as intensidades de fluorescência de cada célula foram analisadas pelo software MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA). No mínimo 200 células foram analisadas por amostra e os valores representam as médias de dois experimentos independentes.

4.2.5 Western blot em extratos de *Xenopus laevis*

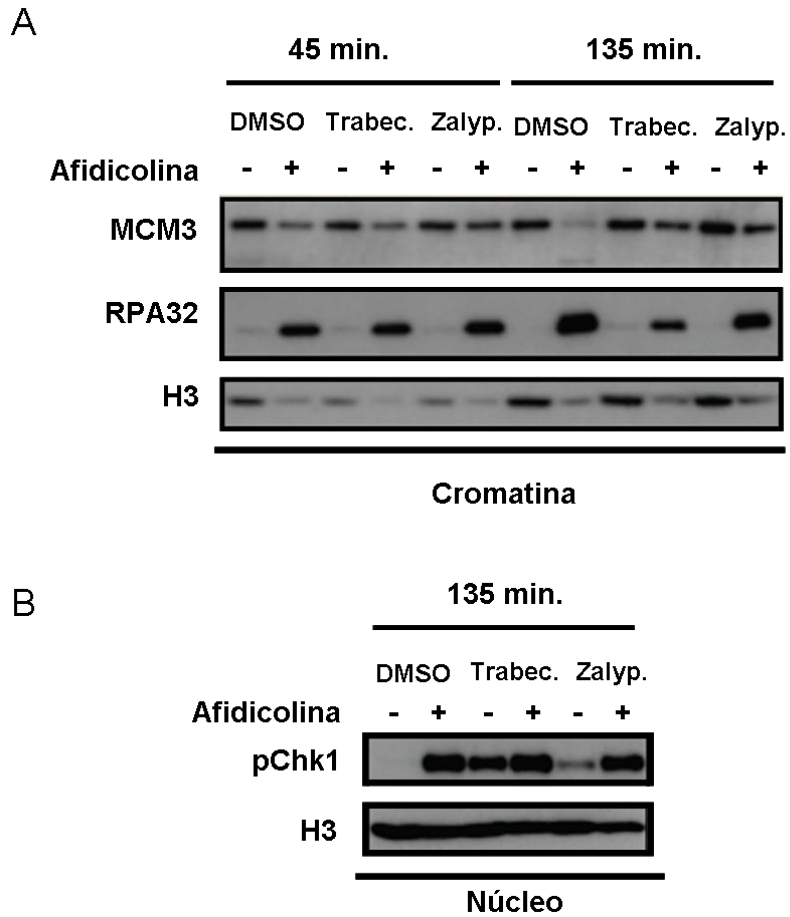


Figura 15. Recrutamento da proteína RPA32 e ativação de CHK1 pelo Zalypsis em extratos de *Xenopus laevis*. Extratos de oócitos foram pré-incubados por 10 minutos com afidicolina 50 μ M, suplementados com mix energético e incubados com o esperma a 37 °C. Após 45 minutos, o Zalypsis foi adicionado e nos períodos indicados, as amostras foram processadas para a extração das proteínas ligadas à cromatina (**A**) ou presentes no núcleo (**B**). O ensaio Western Blot foi realizado conforme descrito em Lutzmann & Méchali (2008).

3. DISCUSSÃO GERAL

Na última década, os progressos nas áreas da biologia celular e molecular proporcionaram a caracterização de vários processos celulares importantes para a patogênese do câncer, como por exemplo, as sinalizações envolvidas no crescimento, proliferação, angiogênese, invasão e metástase (Hanahan & Weinberg, 2011). Por outro lado, o DNA, que há mais de 50 anos é o alvo principal da maioria dos agentes antitumorais, continua desempenhando um papel importante nas novas terapias contra o câncer. Entretanto, ao invés de agir diretamente na molécula do DNA, os novos compostos atuam em vias celulares envolvidas na manutenção da cromatina, como os sistemas de reparação de DNA e de equilíbrio redox (Helleday *et al.*, 2008, D'Incalci & Galmarini, 2010, Underhill *et al.*, 2011, Bhattacharya, 2011b). No presente trabalho, buscou-se investigar os mecanismos de ação de três novos compostos, Zalypsis, Tryptamicidin e 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD), ressaltando principalmente as atividades destes agentes na maquinaria macromolecular.

O Zalypsis e o Tryptamicidin são moléculas estruturalmente relacionadas às ecteinascidinas, possuindo alta similaridade à trabectedina (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009, Leal *et al.*, 2010). Por apresentarem potente atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*, estes agentes estão atualmente sendo avaliados em ensaios clínicos I e II para o tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos e hematológicos (<<http://www.pharmamar.com/productos.aspx>>, acesso em 10/05/11). No entanto, apesar da evolução das pesquisas clínicas,

pouco se sabe sobre os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos citotóxicos do Zalypsis e do Tryptamicidin.

Neste trabalho, foi demonstrado que, assim como a trabectedina, o Zalypsis e o Tryptamicidin apresentam efeitos citotóxicos potentes, apresentando valores de IC₅₀ na faixa pico ou nanomolar em diferentes linhagens celulares tumorais (Fig. 2, Cap. I; Suppl. Fig. S1, Cap. II). Destaca-se que o Tryptamicidin possui um perfil citotóxico semelhante à trabectedina, enquanto que o Zalypsis necessita de concentrações maiores para induzir a mesma citotoxicidade (Fig. 8, Cap. IV). Estas características poderiam ser explicadas pela semelhança estrutural das moléculas, onde o Tryptamicidin apresenta as três subunidades (A, B e C) da trabectedina, e o Zalypsis não possui a subunidade C (Fig. 16).

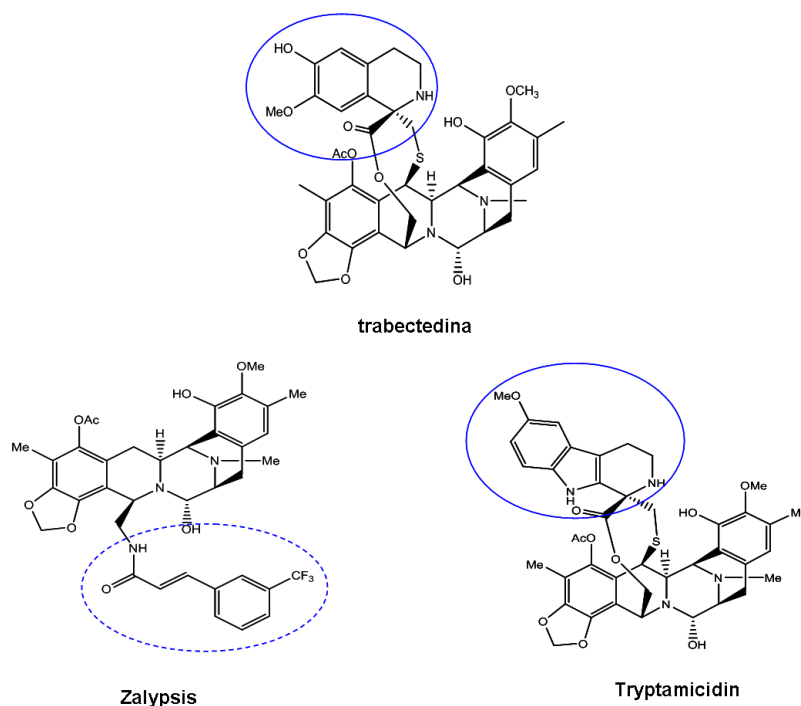


Figura 16. Estruturas químicas dos agentes trabectedina, Zalypsis e Tryptamicidin. As subunidades C da trabectedina e do Tryptamicidin estão destacadas em azul, enquanto a estrutura que corresponderia à subunidade C do Zalypsis está marcada em linha azul pontilhada.

A subunidade C, que na trabectedina permanece projetada para fora da volta menor do DNA, está relacionada à interação com proteínas nucleares e parece ser fundamental para o sequestro de enzimas do NER por este composto. Além disso, a formação do complexo ternário NER-trabectedina-DNA leva ao aumento da atividade citotóxica deste agente alquilante (Moore *et al.*, 1997, Takebayashi *et al.*, 2001).

Considerando a presença da subunidade C no Tryptamicidin, buscou-se investigar a interação deste agente com o NER. Para isso, o ensaio UDS (*unscheduled DNA synthesis*), que avalia a síntese de DNA não programada associada com a reparação pelo NER (Saffi *et al.*, 2010), foi empregado em diferentes linhagens tumorais. Primeiramente, foi observado que o NER parece não participar da reparação das lesões induzidas pelo Tryptamicidin (Fig. 1C, Cap. II). Entretanto, quando as células são expostas à radiação UV, cujas lesões são substratos para o NER, o Tryptamicidin leva ao bloqueio da reparação destas lesões (Fig. 3A e 3C, Cap. II). Estes efeitos também foram demonstrados para a trabectedina, sugerindo que o Tryptamicidin também possui a habilidade de sequestrar as enzimas do NER (Takebayashi *et al.*, 2001).

Visto que o NER é uma das principais vias envolvidas na reparação das lesões no DNA causadas por vários agentes antitumorais utilizados clinicamente, como os compostos platinados (Hoeijmakers, 2009), buscou-se avaliar no Capítulo II a possível ação modulatória do Tryptamicidin e da trabectedina na citotoxicidade da cisplatina e da oxaliplatina em linhagens sensíveis ou resistentes a estes agentes. Baseado no fato que tumores resistentes a agentes platinados apresentam frequentemente alta atividade do

NER (Martin *et al.*, 2008), utilizou-se primeiramente o ensaio UDS para avaliar a atividade do NER em cada linhagem. Como esperado, três entre quatro linhagens resistentes à cisplatina e oxaliplatina utilizadas neste trabalho demonstraram um aumento na atividade do NER quando expostas à radiação UV (Fig. 4, Cap. II). Além disso, não foram observadas diferenças de sensibilidade entre as linhagens sensíveis ou resistentes à cisplatina frente aos tratamentos com o Tryptamicidin ou trabectedina (Fig Suppl. S1 e S2, Cap. II), sugerindo que o aumento da atividade do NER não interferiu na sensibilidade das células a estes compostos. Entretanto, quando fibroblastos foram pré-incubados com as ecteinascidinas e posteriormente expostos ao UV, estes agentes atenuaram a reparação das lesões induzidas pelo UV (Fig. 3, Cap. II). De maneira interessante, o tratamento concomitante do Tryptamicidin com a cisplatina não induziu resistência cruzada nas linhagens resistentes à cisplatina e, em baixas concentrações, apresentou efeitos aditivos e sinérgicos em linhagens sensíveis ou resistentes a este agente (Fig. 4E, Cap. II). Cabe ressaltar que estes resultados corroboram com a resposta terapêutica apresentada pela trabectedina em tumores resistentes à cisplatina, a qual implicou na aprovação deste composto no tratamento de tumores de ovário recorrentes e sensíveis à platina (Schöffski *et al.*, 2011).

No que se refere ao Zalypsis, o NER parece não desempenhar um papel importante na resposta citotóxica deste agente. Recentemente foi observado que células deficientes nas enzimas do NER não mostraram diferenças na sensibilidade ao tratamento com o Zalypsis em relação às células proficientes (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que este efeito pode ser devido à fraca ligação ou ausência de ligação entre o Zalypsis e as

proteínas do NER, que podem estar relacionadas à ausência da subunidade C neste composto (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009).

Embora o Zalypsis possivelmente não forme complexos ternários com o DNA e proteínas do NER, o que o diferencia da trabectedina, foi demonstrado que este agente também é capaz de induzir a formação de DSB, levando à parada no ciclo celular e apoptose (Ocio *et al.*, 2008, Leal *et al.*, 2009, Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009). No Capítulo I, diferentes metodologias foram utilizadas para elucidar os efeitos do Zalypsis na integridade do DNA, replicação e ciclo celular. No entanto, em comparação com os estudos prévios, uma nova abordagem foi empregada com o objetivo de investigar os primeiros processos celulares ativados como resposta ao Zalypsis. Para isso, diferentes linhagens celulares foram expostas ao Zalypsis em baixas concentrações e curtos períodos de tratamento. Corroborando com estudos prévios, o Zalypsis foi capaz de induzir quebras duplas no DNA tanto em células ditas “normais” não tumorais, como a V79B e MRC5, quanto em células tumorais (Fig. 3A e 3B, Cap. I). Resultados similares também foram observados para as células V79B tratadas com a trabectedina ou Tryptamicidin (Fig. 9A, Cap. IV). Por outro lado, linfócitos quiescentes, que permanecem em fase G1 do ciclo celular, não apresentaram quebras simples ou duplas após a exposição aos três agentes alquilantes (Fig. 3C e 3D, Cap. I; Fig. 9B, Cap. IV). Desta forma, a ação genotóxica do Zalypsis e do Tryptamicidin, como demonstrado anteriormente para a trabectedina (Soares *et al.*, 2007), parece estar relacionada à fase do ciclo celular, principalmente à replicação. Cabe ressaltar que este efeito também é observado para outros agentes antineoplásicos genotóxicos, como a mitomicina C e o agente alquilante S23906 (Niedernhofer *et al.*, 2004, Léonce

et al., 2006, Rocca *et al.*, 2010). Acredita-se que, durante a fase S do ciclo celular, os adutos formados pelos agentes podem bloquear o avanço da forquilha de replicação levando, conseqüentemente, à formação de DSB (Helleday *et al.*, 2008).

Como os sistemas de reparação HRR e NHEJ são os principais envolvidos no processamento de DSB (revisado em Branzei & Foiani, 2008, Mladenov & Iliakis, 2011), a participação destas vias na citotoxicidade do Zalypsis foi investigada. No Capítulo IV, foi verificado que as células deficientes nos genes RAD51 (CIV4B) e XRCC3 (Irs1SF), cujas proteínas estão envolvidas no HRR, foram seis vezes mais sensíveis ao Zalypsis em comparação com as linhagens proficientes V79B e AA8 (Fig. 10 e 11, Cap. IV) (San Filippo *et al.*, 2008). Estes efeitos também foram observados para a trabectedina e o Tryptamicidin, onde as linhagens deficientes em HRR foram seis a treze vezes mais sensíveis aos agentes quando comparadas às linhagens proficientes (Fig. 10 e 11, Cap. IV). Por outro lado, o NHEJ parece não estar relacionado à reparação das lesões induzidas pelos três compostos alquilantes, pois a linhagem XRV-15B deficiente no gene que codifica a enzima KU80, importante para o reconhecimento da lesão e recrutamento de outros fatores do NHEJ, não demonstrou diferença de sensibilidade em relação à linhagem proficiente V79B (Fig. 10, Cap. IV) (Mladenov & Iliakis, 2011). Como o HRR é a principal via envolvida na reparação de DSB durante a fase S do ciclo celular (Branzei & Foiani, 2008), a alta sensibilidade apresentada pelas linhagens deficientes nesta via ao tratamento com o Zalypsis ou Tryptamicidin vai ao encontro dos resultados anteriores sobre a indução de DSB por estes agentes durante a replicação.

Além da formação de DSB, a trabectedina e o S23906 também são capazes de inibir a replicação e induzir parada no ciclo celular (D'Incalci & Galmarini, 2010, Soares *et al.*, 2011). Assim como estes agentes, o Zalypsis foi capaz de diminuir a síntese de DNA em linhagens tumorais, verificada pela incorporação do EdU (Fig. 4, Suppl. Fig. S4, Cap. I). É importante ressaltar que tais efeitos também foram observados em extratos de ovos de *Xenopus laevis*, um modelo biológico *in vitro* amplamente utilizado nos estudos sobre a maquinaria de replicação do DNA (Philpott & Yew, 2008, Méchali, 2010). Neste sistema, os extratos de oócitos possuem a maquinaria celular necessária para a replicação e, quando o DNA do esperma é adicionado juntamente com cofatores, a replicação é iniciada em alguns minutos, o que torna possível controlar o início da replicação. Como ilustrado no Capítulo IV, o Zalypsis foi capaz de bloquear totalmente a síntese de DNA quando adicionado no momento inicial da replicação, como verificado pela incorporação do nucleotídeo radioativo $\alpha(P^{32})dCTP$ (Fig. 12A, Cap. IV). Entretanto, ao analisar a cromatina após a incubação com o Zalypsis, foi detectado que não houve a descondensação da cromatina e formação da membrana nuclear, as quais são fundamentais para a replicação (Fig. 12B, Cap. IV). Desta forma, o bloqueio da replicação pelo Zalypsis não seria um efeito direto na replicação. Para descartar esta hipótese, a reação foi iniciada e após 45 minutos, período no qual a replicação já começou, o Zalypsis foi adicionado ao extrato. Como esperado, este agente foi capaz de bloquear a síntese de DNA (Fig. 13A, Cap. IV), ressaltando o efeito inibidor do Zalypsis na elongação da replicação. Entretanto, este fenômeno não ocorreu na replicação de DNA fita simples (Fig. 13B, Cap. IV), que não requer a montagem do complexo pré-replicativo

(Lutzmann & Méchali, 2008). Estes resultados sugerem que o bloqueio da replicação pelo Zalypsis depende da presença da maquinaria nuclear envolvida na replicação.

Considerando que o bloqueio na replicação induzido por lesões no DNA é geralmente acompanhado pela ativação de proteínas de *checkpoint* e consequente parada no ciclo celular (revisado em Hoeijmakers, 2011), a ação do Zalypsis nestes processos foi investigada. Como evidenciado no Capítulo I, as células tumorais tratadas com o Zalypsis não mostraram parada nas fases S ou G2/M do ciclo celular, o que é normalmente observado para outros compostos genotóxicos que bloqueiam a replicação (Rocca *et al.*, 2010, Hoeijmakers, 2011). Por outro lado, a exposição ao Zalypsis, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de induzir acúmulo de células na fase sub-G1 precocemente (Fig. 5, 7A, Cap. I). Em adição, foi verificado que este acúmulo na fase sub-G1 ocorreu de maneira similar à ativação da caspase-3 (Fig. 7A e 7B, Cap. I), ressaltando a participação da via das caspases na morte celular induzida por este composto.

Com base nestas observações, o Zalypsis parece agir no DNA causando inibição da replicação sem disparar, no entanto, as sinalizações de *checkpoint* clássicas responsáveis pela parada do ciclo celular. Assim, para confirmar esta hipótese, células expostas ao Zalypsis foram verificadas quanto à ativação das enzimas ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM and RAD3-related*), as quais são as principais cinases envolvidas nas sinalizações de *checkpoint* em respostas a danos no DNA e estresse na replicação, respectivamente (revisado em McNeely *et al.*, 2010). Utilizando imunocitoquímica, foi observado no Capítulo IV que células HeLa-M expostas ao Zalypsis não apresentaram

marcação para pATM (fosforilada na Ser1981) ou ativação da via da ATR, verificada pelo recrutamento da RPA à cromatina e pela fosforilação de CHK1 (Ser317) (Fig. 14, Cap. IV), as quais são ativadas à montante de ATR (Fig. 17) (Branzei & Foiani, 2008). Em extratos de *X. laevis*, o Zalypsis também não mostrou ativar a RPA e induziu uma fraca fosforilação de CHK1 (Fig. 15, Cap. IV). Desta forma, a ausência de ativação das vias clássicas de *checkpoint* pelo Zalypsis explicariam a ausência de parada no ciclo celular após o tratamento com este agente.

Outra observação importante é que o Zalypsis e o S23906 possuem a capacidade de se ligar na mesma posição N2 de guaninas na volta menor do DNA e, no entanto, estes compostos induzem respostas celulares muito diferentes em vários aspectos. Conforme descrito em estudos prévios, o S23906 é capaz de induzir quebras duplas, disparar as sinalizações envolvidas em *checkpoint* e levar à parada do ciclo celular (Léonce *et al.*, 2006, Rocca *et al.*, 2010, Soares *et al.*, 2011). Estes resultados também foram verificados neste trabalho, onde o S23906 induziu forte ativação de γ H2AX, parada na fase S do ciclo celular e ativação de RPA e CHK1 (Fig. 3B, 3C e 6, Cap. I; Fig. 7B, Cap. IV). Considerando que o S23906 tem a habilidade de causar a abertura da hélice do DNA, levando à exposição de fragmentos de DNA fita simples (*single stranded DNA*, ssDNA) (David-Cordonnier *et al.*, 2005), é facilmente justificável o recrutamento de RPA e, conseqüente, ativação da via da ATR, visto que a principal função da RPA é a ligação em resíduos de ssDNA e ativação de ATRIP e ATR, o que leva à ativação de CHK1 (Cimprich & Cortez, 2008, Fig. 17).

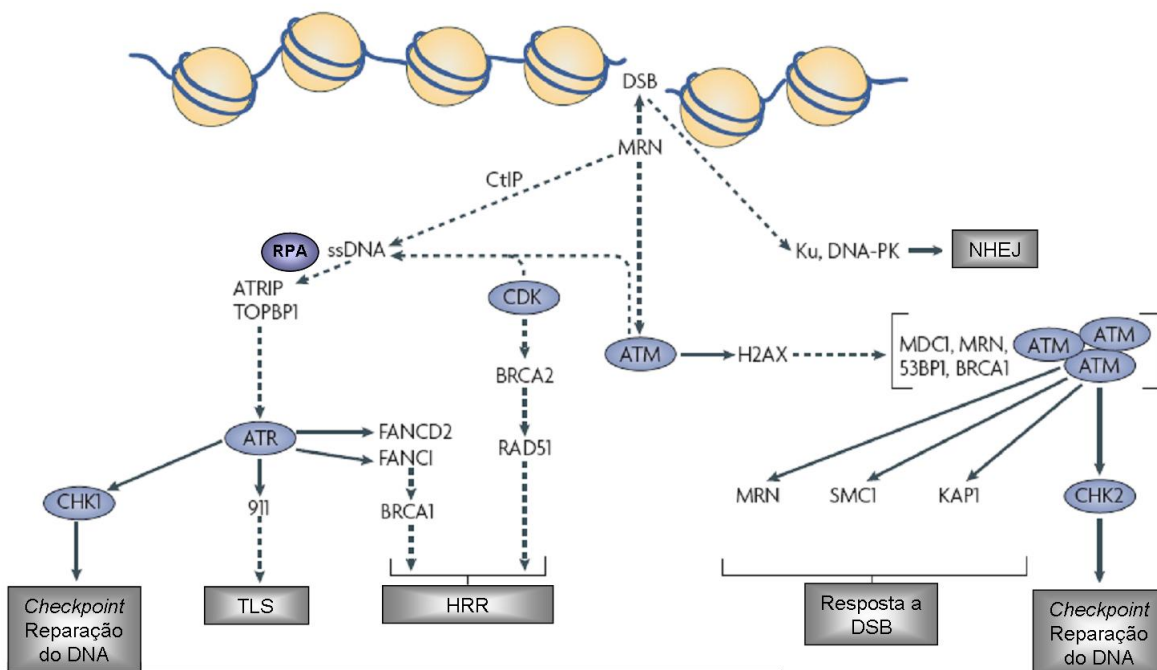


Figura 17. Principais sinalizações envolvidas na resposta celular à formação de DSB. O complexo MRN (MRE11-RAD50 – NBS1) ou KU80 se ligam às DSB e ativam as cinases ATM ou DNA-PK, respectivamente. KU80 e DNA-PK promovem o reparo NHEJ. Durante as fases S e G2, as DSB podem ser clivadas por MRN ou CtIP expondo ssDNA, que é reconhecido por RPA. RPA se liga ao ssDNA e ativa ATRIP e TOPBP1, que levam à ativação de ATR. Quando a ATM é ativada, ela induz mudanças na cromatina ao redor das DSB e fosforila H2AX, que leva ao recrutamento de vários fatores de checkpoint e reparo, como MDC1 e MRN. Estes fatores, por sua vez, recrutam BRCA1 e 53BP1, que ativam outras moléculas, dentre elas a própria ATM que amplifica a sinalização que pode levar ao relaxamento da cromatina pela fosforilação de KAP1, e ativação do reparo pela ativação das proteínas MRN e SMC1. A fosforilação de CHK2 por ATM e de CHK1 por ATR amplificam a sinalização de danos pela célula, o que pode levar à parada do ciclo celular. Além disso, ATM e ATR podem ativar outras enzimas envolvidas na reparação de DNA como BRCA1, BRCA2, RAD51, FANCD2, FANCI e enzimas do complexo 9-1-1 entre outras. As setas indicam eventos diretos e as setas pontilhadas indicam eventos indiretos (adaptado de Branzei & Foiani, 2008 e Cimprich & Cortez, 2008).

Enquanto isso, o Zalypsis pode causar o fechamento da molécula, formando uma estrutura similar a um *crosslink*, efeito já descrito para a trabectedina (D’Incalci & Galmarini, 2010). Assim, se o Zalypsis leva à formação de ssDNA, estes resíduos não seriam suficientes e/ou não ficariam expostos para o recrutamento de RPA e ativação da sinalização de *checkpoint*

via ATR. Desta forma, a atividade citotóxica superior demonstrada pelo Zalypsis em comparação com o S23906 pode estar relacionada à habilidade do primeiro em escapar das vias de sinalização de danos no DNA. Estes exemplos ressaltam que, além da sequência de ligação ao DNA, as mudanças conformacionais da cromatina são fundamentais para a sinalização celular e podem decidir a sobrevivência da célula.

Em resumo, os dados apresentados neste trabalho sugerem que o Zalypsis, mesmo em baixas concentrações e curtos períodos de tratamento, exerce o seu efeito citotóxico principalmente pela indução de DSB durante a replicação e pelo bloqueio da mesma. Além disso, este agente não ativa as vias clássicas de *checkpoint*, não induzindo, com isso, a parada do ciclo celular. Consequentemente, as células não teriam tempo suficiente para reparar as lesões induzidas pelo Zalypsis, entrando precocemente em processo de morte celular (Fig. 18).

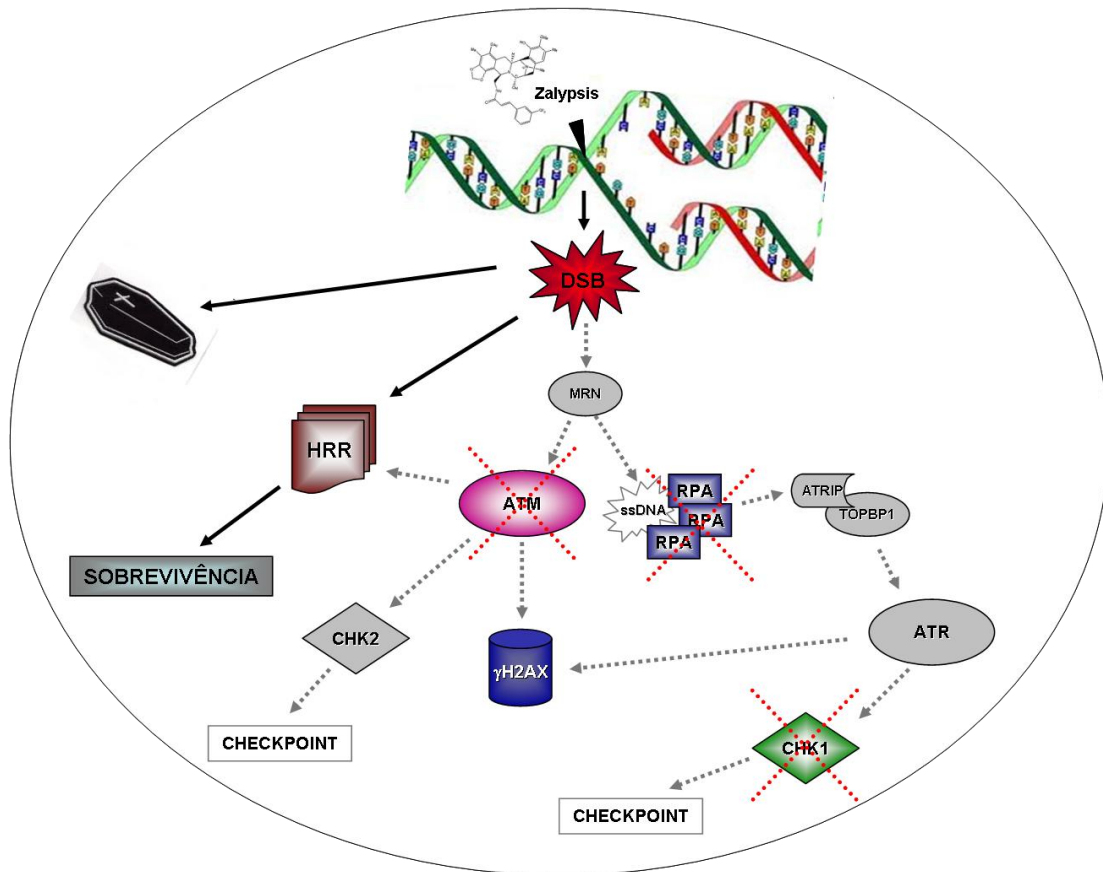


Figura 18. Principais sinalizações envolvidas na resposta celular ao Zalypsis. Neste trabalho foi verificado que o Zalypsis é capaz de induzir a formação de DSB de maneira dependente de replicação. Embora uma fraca ativação de γ H2AX seja observada após a formação de DSB, a via da ATM ou da ATR não são ativadas, como evidenciado pela ausência da fosforilação de ATM e CHK1 e de recrutamento de RPA à cromatina. Desta forma, a progressão do ciclo celular não é afetada e, se o sistema HRR não conseguir reparar as lesões causadas pelo Zalypsis, a célula dispara os mecanismos de morte celular precocemente. Setas pretas e figuras coloridas: sinalizações verificadas neste trabalho. Setas e figuras cinzas: sinalizações clássicas que não foram testadas diretamente.

Adicionalmente, foi mostrado que baixas concentrações de Zalypsis são suficientes para provocar morte celular sem, no entanto, induzir a potente marcação de γ H2AX demonstrada em trabalhos recentes (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009, Ocio *et al.*, 2009, Colado *et al.*, 2010). Assim, sugere-se que esta ativação de γ H2AX pode estar relacionada ao processo de morte celular, visto

que estes trabalhos utilizaram concentrações muito elevadas e longos períodos de tratamento. No entanto, os fatores envolvidos na fraca fosforilação de H2AX bem como na ativação da via das caspases pelo Zalypsis são questões que permanecem sem ser elucidadas.

Por outro lado, o Tryptamicidin apresenta um mecanismo de ação muito similar à trabectedina em diferentes modelos celulares, interagindo com as proteínas do NER, o que pode ser importante na sensibilização das células tumorais ao tratamento com outros agentes que induzem lesões reparadas por esta via, como os compostos platinados.

Diferente das ecteinascidinas, os mecanismos envolvidos na ação do DFDD no DNA está em fase inicial de investigação. Entretanto, interessantes resultados foram encontrados neste trabalho, como verificado no Capítulo III. Utilizando linhagens de bactérias, leveduras e de células de mamífero em cultura, o perfil genotóxico e mutagênico deste composto foi avaliado. O DFDD, ao contrário do seu análogo difenil disseleneto (DPDS), não foi mutagênico e foi capaz de proteger as células contra a mutagenicidade induzida pelo agente oxidante peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em linhagens de *Salmonella typhimurium* e de *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. 1-4, Cap. III). Em células V79, o DFDD mostrou uma fraca ação genotóxica, verificada pela indução de quebras no DNA em células V79 tratadas por 3 horas com este agente (Fig. 3, Cap. III). Neste cenário, Santos e colaboradores (2009) observaram resultados similares, onde o DFDD induziu aumento no índice de danos no DNA em leucócitos somente quando utilizado em altas concentrações. Por outro lado, em baixas concentrações, este composto selenado foi capaz de proteger contra a genotoxicidade induzida pelo H_2O_2 (Fig. 4, Cap. III), sugerindo que o

DFDD também possui uma ação antioxidante neste modelo biológico. Desta forma, a proteção do DNA induzida pelo DFDD seria uma ação indireta, onde este composto atuaria neutralizando a ação de agentes oxidantes genotóxicos, levando, com isso, à proteção da molécula do DNA. Cabe ressaltar que em modelos *in vivo*, o DFDD também apresentou atividade antioxidante, protegendo células cerebrais contra a peroxidação lipídica e contra a estereotípiia induzida por apomorfina, um agente indutor de estresse oxidativo (Meotti *et al.*, 2004, Machado *et al.*, 2006).

Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na ação antioxidante demonstrada pelo DFDD, os efeitos diretos deste composto na degradação de duas espécies reativas de oxigênio, H_2O_2 e o radical superóxido (O_2^-), foram avaliados. Utilizando modelos *in vitro*, detectou-se que o DFDD foi capaz de aumentar a degradação do H_2O_2 mais eficientemente do que seu análogo DPDS (Tab. 5, Cap. III). No entanto, ambos os compostos não mostraram atividade sobre O_2^- , como verificado pela geração de O_2^- pela auto-oxidação da adrenalina (danos não mostrados). Tais resultados ressaltam a ação específica do DFDD sobre a molécula do H_2O_2 (Tab. 5, Cap. III), sugerindo uma atividade catalase-*like* deste agente. Em adição, utilizando espectrometria de massas, foi demonstrado que o DFDD reage com o H_2O_2 gerando espécies diferentes daquelas geradas pela reação do DPDS com este agente oxidante (Fig. 6A e 6B, Cap. III). Destaca-se que os produtos gerados pela reação dos dois compostos com o H_2O_2 são similares às espécies intermediárias geradas durante o ciclo redox da glutathione peroxidase (GPx) (Mugesh *et al.*, 2001), o que vai ao encontro com a atividade GPx-*like* do DPDS demonstrada em trabalhos prévios (Rosa *et al.*, 2007).

Compostos de selênio frequentemente apresentam propriedades antioxidantes que, na maioria das vezes, são associadas ao aumento da atividade das enzimas GPx e tiorredoxina redutase (TR) (Lu & Jiang, 2005, Selenius *et al.*, 2010). Esta potencialização da GPx ou TR pode ser devido a um aumento na expressão destas proteínas ou pela mimetização de suas atividades, como observado, por exemplo, para a selenometionina e pelos compostos ebselen e DPDS, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2008, Freitas *et al.*, 2010).

Considerando que vários tipos de câncer, como os tumores de mama, cólon e reto e leucemias, apresentam desequilíbrio redox com acúmulo de danos oxidativos e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (Kryston *et al.*, 2011), a utilização de compostos de selênio na terapia antitumoral se torna um novo campo a ser explorado. Recentemente, foi demonstrado que a selenometionina possui ação protetora contra os efeitos tóxicos causados pelos agentes antineoplásicos irinotecano, cisplatina, bleomicina e doxorubicina em tecidos normais em diferentes modelos experimentais (Zhang *et al.*, 2008, Santos & Takahashi, 2008, Laffon *et al.*, 2010). É importante salientar que esta proteção parece ser seletiva, pois a selenometionina aumentou a proteção de células normais e tornou as células tumorais mais sensíveis à ação tóxica do irinotecano (Zhang *et al.*, 2008). Por outro lado, a selenometionina causou um aumento na reparação das lesões genotóxicas induzidas pela bleomicina e doxorubicina, o que levaria a uma diminuição da citotoxicidade destes agentes antitumorais (Santos & Takahashi, 2008, Laffon *et al.*, 2010). Também foi verificado que outros compostos selenados têm apresentado resultados antitumorais promissores, atuando de diferentes maneiras no microambiente

tumoral (Bhattacharya *et al.*, 2011a). Desta forma, os compostos de selênio podem atuar ao mesmo tempo como adjuvantes ou como antagonistas no tratamento antitumoral, o que ressalta a necessidade de uma maior compreensão das atividades específicas de cada composto selenado. No presente trabalho, foi demonstrado pela primeira vez que o composto orgânico de Se DFDD foi capaz de proteger o DNA contra a genotoxicidade e mutagenicidade induzidas pelo agente oxidante H_2O_2 e que esta atividade antioxidante poderia estar relacionada à ação direta do DFDD na degradação do H_2O_2 . Entretanto, a ação do DFDD em outros sistemas antioxidantes como as enzimas GPx e TR bem como a interação com tióis celulares necessitam ser investigadas.

Em resumo, neste trabalho, foram encontrados resultados interessantes para os três novos compostos Zalypsis, Tryptamicidin e DFDD que contribuem para elucidação dos mecanismos de ação desses agentes. Além disso, foi possível identificar vias celulares importantes nas atividades citotóxicas do Zalypsis e Tryptamicidin que podem auxiliar na escolha de tumores mais suscetíveis aos tratamentos com estes agentes, como por exemplo, tumores que apresentam mutações nos genes implicados no HRR. Por outro lado, as propriedades antioxidantes do DFDD poderiam ser empregadas na proteção de tecidos normais contra os efeitos nocivos de medicamentos antitumorais que geram espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (Ferreira *et al.*, 2008). Desta forma, estudos adicionais sobre as atividades farmacológicas das três moléculas tornam-se necessários para uma utilização mais eficaz desses compostos como agentes

únicos ou como adjuvantes que poderão implicar na melhoria da terapia antitumoral.

4. CONCLUSÕES

4.1 Conclusão Geral

As evidências pré-clínicas e clínicas do Zalypsis e do Tryptamicidin sugerem que estes agentes possuem mecanismos de ação distintos quando comparados a outros agentes antitumorais que também agem diretamente no DNA. Neste trabalho, empregando diferentes metodologias, foi evidenciado que ambos os compostos induzem quebras duplas no DNA e que estas lesões são geradas principalmente durante a replicação do DNA. Além disso, utilizando linhagens deficientes e proficientes em HRR, foi possível detectar que esta via está implicada na reparação das lesões induzidas pelo Zalypsis e Tryptamicidin. É importante ressaltar que os resultados obtidos no presente trabalho permitiram mostrar pela primeira vez que o Zalypsis, mesmo em baixas concentrações e curtos períodos de tratamento, também apresenta potente atividade citotóxica sem induzir a clássica resposta celular a danos no DNA (*DNA damage response*, DDR). Adicionalmente, foi observado que o DFDD possui interessantes propriedades antioxidantes que levou à proteção do DNA contra a ação genotóxica e mutagênica do agente oxidante peróxido de hidrogênio.

Os dados apresentados nesta tese contribuem para elucidação dos mecanismos de ação dos três agentes Zalypsis, Tryptamicidin e DFDD, ressaltando a importância dessas moléculas como agentes únicos ou em associação na terapia antitumoral.

4.2 Conclusões Específicas

- O Zalypsis e o Tryptamicidin apresentam potente atividade citotóxica, mostrando valores de IC₅₀ na faixa nanomolar em diferentes linhagens celulares tumorais;
- Os dois compostos são capazes de induzir a formação de quebras duplas no DNA de maneira dependente de replicação;
- As lesões induzidas pelo Zalypsis e Tryptamicidin são processadas pelo sistema de reparação por recombinação homóloga;
- O Tryptamicidin é capaz de atenuar a atividade do NER no reparo de lesões induzidas pelo UV, sem, no entanto ser reparado por esta via;
- Diferente de muitos compostos antineoplásicos que também possuem o DNA como principal alvo celular, o Zalypsis não dispara parada no ciclo celular e as vias clássicas de *checkpoint* e ativa rapidamente a sinalização de morte celular.
- O Tryptamicidin apresenta a mesma citotoxicidade em linhagens resistentes ou sensíveis à cisplatina e quando as células são expostas aos dois agentes concomitantemente, o Tryptamicidin mostra efeito aditivo ou sinérgico à cisplatina;
- O composto selenado DFDD induz a formação de quebras no DNA somente em altas concentrações. No entanto, em baixas concentrações, este composto protege contra a ação genotóxica do peróxido de hidrogênio.
- O DFDD não é mutagênico em linhagens de *Salmonella typhimurium* e de *Saccharomyces cerevisiae* e é capaz de proteger contra a

mutagenicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio nos dois modelos experimentais.

- Utilizando ensaios *in vitro* foi possível detectar que o DFDD, diferentemente do seu análogo difenil disseleneto, possui uma ação catalase-*like* agindo diretamente na molécula do H₂O₂.

5. PERSPECTIVAS

Embora muitos resultados tenham sido encontrados no desenvolvimento deste trabalho que permitiram a elucidação de aspectos importantes no mecanismo de ação dos agentes Zalypsis, Tryptamicidin e DFDD, algumas questões permanecem para serem exploradas para uma melhor compreensão das vias implicadas nas respostas celulares a estes agentes. Desta forma, algumas ideias estão descritas a seguir:

- Aprofundar os estudos na reparação das lesões induzidas pelos agentes Zalypsis e Tryptamicidin, investigando o envolvimento do sistema de reparação de bases mal emparelhadas e de síntese translesão, utilizando linhagens celulares proficientes e deficientes nestas vias.
- Avaliar a participação do complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), o qual é envolvido principalmente no reconhecimento de quebras duplas e na ativação de vias de reparação de DNA, nos danos no DNA causados pelos compostos Zalypsis e Tryptamicidin usando imunocitoquímica;
- Utilizando linhagens celulares proficientes e deficientes em enzimas da família FA, principalmente FANCD2 e FANCI, investigar a importância destas enzimas na citotoxicidade induzida pelo Zalypsis e Tryptamicidin.
- Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica do DFDD em linhagens tumorais;

- Avaliar a atividade antígeno-tóxica do DFDD em linhagens normais e tumorais expostas aos compostos antineoplásicos doxorrubicina e bleomicina.
- Investigar o perfil redox das células tumorais após o tratamento com o DFDD.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan, B.C., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 19:1–16.1999.
- Aubel-Sadron, G., Londos-Gagliardi, D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 66(5):333-52. 1984.
- Aviles, P., Galmarini, C., Cuevas, C., Guillen, M.J., Frapolli, R., Uboldi, S., Romano, M., Tavecchio, M., Erba, E., Bello, E., D'Incalci, M. Mechanism of action and antitumor activity of PM01183 In: Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR: Denver, CO, Abstract 2679. 2009.
- Banerjee, D., Mayer-Kuckuk, P., Capiiaux, G., Budak-Alpdogan, T., Gorlick, R., Bertino, J.R. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta* 1587:164–173. 2002.
- Bhattacharya, A. Methylselenocysteine – a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011.
- Bhattacharya, A., Tóth, K., Sen, A., Seshadri, M., Cao, S., Durrani, F.A., Faber, E., Repasky, E.A., Rustum, Y.M. Inhibition of colon cancer growth by methylselenocysteine-induced angiogenic chemomodulation is influenced by histologic characteristics of the tumor. *Clin Colorectal Cancer* 8 (3):155–162, 2009.
- Bhattacharya, A., Turowski, S.G., Dominguez San Martin, I., Rajput, A., Rustum, Y.M., Hoffman, R.M., Seshadri, M. Magnetic resonance and fluorescence–protein imaging of the anti-angiogenic and anti-tumor efficacy of selenium in an orthotopic model of human colon cancer. *Anticancer Res* 31: 387-394. 2011.
- Branzei, D., Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 9: 297-308. 2008.
- Brozmanová, J., Maniková, D., Vlcková, V., Chovanec, M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 84:919–938. 2010.
- Bruning, A., Mylonas, I. New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2010.
- Brüning, C.A., Prigol, M., Roehrs, J.A., Nogueira, C.W., Zeni, G. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect caused by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. *Behav Brain Res* 205(2):511-7. 2009.
- Brüning, C.A., Prigol, M., Roehrs, J.A., Zeni, G., Nogueira, C.W. Evidence for the involvement of μ -opioid and δ -opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. *Behav Pharmacol* 21(7):621-6. 2010.

- Brüning, C.A., Souza, A.C., Gai, B.M., Zeni, G., Nogueira, C.W. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* 658(2-3):145-9. 2010.
- Braña, M.F., Cacho, M., Gradillas, A., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A. Intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 1745-80. 2001.
- Caponigro, F., Lorusso, D., Fornari, G., Barone, C., Merlano, M., Airolidi, M., Schena, M., MacArthur, R., Weitman, S., Jannuzzo, MG, Crippa, S., Fiorentini, F., Petroccione, A., Comis, S. Phase I dose-escalation study of brostallicin, a minor groove binder, in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 66:389–394. 2010.
- Casado, J.A., Río, P., Marco, E., García-Hernández, V., Domingo, A., Pérez, L., Tercero, J.C., Vaquero, J.J., Albella, B., Gago, F., Bueren, J.A. Relevance of the Fanconi Anemia pathway in the response of human cells to trabectedin. *Mol Cancer Ther* 7(5):1309-18. 2008.
- Chabner, B.A, Roberts Jr, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Rev: Cancer* 5:65-72. 2005.
- Cimprich, K.A., Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8):616-27. 2008.
- Clark, L.C., Combs Jr., G.F., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Leshner Jr., J.L., Park, H.K., Sanders Jr., B.B., Smith, C.L., Taylor, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 276, 1957–1963. 1996.
- Damia, G., Imperatori, L., Stefanini, M., D’Incalci, M. Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents. *Int J Cancer* 66(6):779–83.1996.
- De Silva, I.U., McHugh, P.J., Clingen, P.H., Hartley, J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20(21):7980-90. 2000.
- D’Incalci, M, Galmarini, C.M. A review of Trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther* 9(8) 2157-2163. 2010.
- Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C.L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031-1037. 2001.
- El-Bayoumy, K., Das, A., Narayanan, B., Narayanan, N., Fiala, E.S., Desai, D., Rao, C.V., Amin, S., Sinha, R. Molecular targets of the chemopreventive agent 1,4-phenylenebis (methylene)-selenocyanate in human non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27(7):1369-76. 2006.
- Faircloth, G., Cuevas, C. Kahalalide F and ES285: potent anticancer agents from marine molluscs. *Prog Mol Subcell Biol* 43: 363–379. 2006.
- Ferreira, A.L., Matsubara, L.S., Matsubara, B.B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6(4):278-81. 2008.

Fischer, J.L., Mihelc, E.M., Pollok, K.E., Smith, M.L. Chemotherapeutic selectivity conferred by selenium: a role for p53-dependent DNA repair. *Mol Cancer Ther* 6(1). 2007.

Foster, E.R., Downs, J.A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J* 272(13):3231–40. 2005.

Freitas, A.S., Prestes, A.S., Wagner, C., Sudati, J.H., Alves, D., Porciúncula, L.O., Kade, I.J., Rocha, J.B.T. Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity. *Molecules* 15: 7699-7714. 2010.

Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., Wood, R.D. DNA repair, from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5:986–996. 2006.

Ganjoo, K.N., Patel, S.R. Trabectedin: an anticancer drug from the sea. *Expert Opin Pharmacother* 10(16). 2009.

Galetta, D., Rossi, A., Pisconti, S., Millaku, A., Colucci, G. Maintenance or non-maintenance therapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: that is the question. *Cancer Treat Rev* 36 (3):S30-3. 2010.

GLOBOCAN IARC, disponível em <<http://globocan.iarc.fr>> acessado em 02/04/11.

Grem, J.L. *Seminars in Radiation Oncology* 7(4):249-259. 1997.

Guillen, M.J., Lepage, D., Grant, W., Cuevas, C., Aviles, P. Antitumor activity of PM00104 in hepatocellular carcinoma (HCC) experimental models. In: *Proceedings of the 100 th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR: Denver, CO, Abstract 2018.* 2009.

Guillen, M.J., Lepage, D., Grant, W., Cuevas, C., Aviles, P. Evaluation of antitumor activity of PM00104 in combined with Cisplatin in experimental models of bladder and gastric tumors. In: *Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR: Denver, CO, Abstract 2682.* 2009.

Guirouilh-Barbat, J., Redon, C., Pommier, Y. Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Mol Biol Cell* 19: 3969–3981. 2008.

Guirouilh-Barbat, J., Antony, S., Pommier, Y. Zalypsis (PM00104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition. *Mol Cancer Ther* 8(7):2007-14. 2009.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5):646-74. 2011.

Hegi, M.E., Diserens, A.C., Godard, S., Dietrich, P.Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., Stupp, R. Clinical Trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 10: 1871–1874. 2004.

- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997-1003. 2005.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., Sharma, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Rev* 8:193-204. 2008.
- Hlavin, E.M., Smeaton, M.B., Miller, P.S. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. *Environ Mol Mutag* 51: 604-624. 2010.
- Hoeijmakers, J.H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 8;361(15):1475-85. 2009.
- Honeggar, M., Beck, R., Moos, P.J. Thioredoxin reductase 1 ablation sensitizes colon cancer cells to methylseleninate-mediated cytotoxicity. *Toxicol App Pharmacol* 241 348–355. 2009.
- Hu, H., Li, G., Wang, L., Watts, J., Combs Jr, G.F., Lu, J. Methylseleninic acid enhances taxane drug efficacy against human prostate cancer and down-regulates antiapoptotic proteins bcl-xl and survivin. *Clin Cancer Res* 14(4). 2008.
- Hurley, L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Rev* 2:189-200. 2002.
- INCA. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro, 2009, disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa>>, acesso em 02/04/11.
- Jiang, C., Ganther, H., Lu, J. Monomethyl selenium-specific inhibition of MMP-2 and VEGF expression: implications for angiogenic switch regulation. *Mol Carcinog* 29: 236-250. 2000.
- Jiang, C., Jiang, W., Ip, C., Lu, J. Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol Carcinog* 26: 213-225. 1999.
- Kade, I.J., Rocha, J.B.T. Comparative study on the influence of subcutaneous administration of diphenyl and dicholesteroyl diselenides on sulphhydryl proteins and antioxidant parameters in mice. *J Appl Toxicol* 30: 688–693. 2010.
- Kim, Y.J., Baek, S.H., Bogner, P.N., Ip, C., Rustum, Y.M., Fakhri, M.G., Ramnath, N., Park, Y.M. Targeting the Nrf2–Prx1 pathway with selenium to enhance the efficacy and selectivity of cancer therapy. *J Cancer Mol* 3:37–43. 2007.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen*. 2011.
- Laffon, B., Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J. The organic selenium compound selenomethionine modulates bleomycin-induced DNA damage and repair in human leukocytes. *Biol Trace Elem Res* 133(1):12-9. 2009.

- Larsen, A.K., Ouaret, D., El Ouadrani, K., Petitprez, A. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol Therap*, 131 (1):80-90. 2011.
- Larsen, A.K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 99(2):167-81. 2003.
- Larsen, A., Escargueil, A. Les cibles liées à la réplication, à l'expression et à la stabilité du génome, em Raymond, E. *Thérapie ciblée des cancers – Le concept de cible em oncologie*. 2009.
- Leal, J.F., García-Hernández, V., Moneo, V., Domingo, A., Bueren-Calabuig, J.A., Negri, A., Gago, F., Guillén-Navarro, M.J., Avilés, P., Cuevas, C., García-Fernández, L.F., Galmarini, C.M. Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis in several human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 78:162–170. 2009.
- Leal, J.F., Martínez-Díez, M., García-Hernández, V., Moneo, V., Domingo, A., Bueren-Calabuig, J.A., Negri, A., Gago, F., Guillén-Navarro, M.J., Avilés, P., Cuevas, C., García-Fernández, L.F., Galmarini, C.M. PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity. *Br J Pharmacol* 161(5):1099-110. 2010.
- Lenglet, G., David-Cordonnier, M.H. DNA-destabilizing agents as an alternative approach for targeting DNA: mechanisms of action and cellular consequences. *J Nucleic Acids*. 2010.
- Léonce, S., Kraus-Berthier, L., Golsteyn, R.M. David-Cordonnier, M.H., Tardy, C., Lansiaux, A., Poindessous, V., Larsen, A.K., Pierré, A. Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1. *Cancer Res* 66, 7203-10. 2006.
- Leoni, M.L., Bailey, B., Reifert, J., Bendall, H.H., Zeller, R.W., Corbeil, J., Elliott, G., Niemeyer, C.C. Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clin Cancer Res* 14(1): 309-17. 2008.
- Letavayová, L., Vlcková, V., Brozmanová, J. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 227: 1–14. 2006.
- Leung, M., Rosen, D., Fields, S., Cesano, A., Budman, D.R. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition: preclinical and clinical development of synthetic lethality. *Mol Med*. 2011.
- Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden 3rd, J.D., Crawford, E.D., Goodman, G.E., Claudio, J., Winkler, E., Cook, E.D., Karp, D.D., Walther, P., Lieber, M.M., Kristal, A.R., Darke, A.K., Arnold, K.B., Ganz, P.A., Santella, R.M., Albanes, D., Taylor, P.R., Probstfield, J.L., Jagpal, T.J., Crowley, J.J., Meyskens Jr., F.L., Baker, L.H., Coltman Jr., Lobanov, A.V., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2009. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1790:1424–1428. 2009.
- Lu, J., Jiang, C. Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxid Redox Signal* 7:1715-27. 2005.

Lutzmann, M., Méchali, M. MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol Cell* 25;31(2):190-200. 2008.

Machado, M.S., Rosa, R.M., Dantas, A.S., Reolon, G.K., Appelt, H.R., Braga, A.L. Henriques, J.A.P., Roesler, R. An organic selenium compound blocks apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci Lett* 410:198–202. 2006.

Maiorano, D., Lutzmann, M., Méchali, M. Recombinant Cdt1 induces rereplication of G2 nuclei in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* 15, 146–153. 2005.

Martin, L.P., Hamilton, T.C., Schilder, R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 1(14):1291-5. 2008.

Matuo, R., Sousa, F.G., Escargueil, A.E., Grivicich, I., Garcia-Santos, D., Chies, J.A., Saffi, J., Larsen, A.K., Henriques, J.A. 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J Appl Toxicol* 29(4):308-16. 2009.

McNeely, S., Conti, C., Sheikh, T., Patel, H., Zabludoff, S., Pommier, Y., Schwartz, G., Tse, A. Chk1 inhibition after replicative stress activates a double strand break response mediated by ATM and DNA-dependent protein kinase. *Cell Cycle* 9(5):995-1004. 2010.

Méchali, M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Rev: Mol Cell Biol* 11:728-738. 2010.

Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 94: 276-282. 2004.

Minniti, G., Muni, R., Ianzetta, G., Marchetti, P., Enrici, R.M. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents *Anticancer Res.* 29:5171-84. 2009.

Misra, H.P., Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175. 1972.

Mladenov, E., Iliakis, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways *Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen.* 2011.

Mladenov, E., Tsaneva, I., Anachkova, B. Activation of the S Phase DNA Damage checkpoint by Mitomycin C. *J Cell Physiol* 211: 468–476. 2007.

Moneo, V., Martinez-Leal, J., Guillen, M.J., Martinez, P., Tarazona, G., Aviles, P., Cuevas, C., Garcia-Fernandez, L., Galmarini, C. PM01183 is a novel compound that binds DNA and displays cytotoxic effects *in vitro* and *in vivo* in human cancer cell lines. In: Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR: Denver, CO, Abstract 4525. 2009.

Moore, B.M., Seaman, F.C., Hurley, L.H. NMR-based model of an Ecteinascidin 743-DNA adduct. *J Am Chem Soc* 119: 5475-5476. 1997.

Mugesh, G.; Dumont, W.W.; Sies, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* 101, 2125-2179. 2001.

Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. Structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24, 5776-87. 2004.

Nogales, E. Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:397–420. 2001.

Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G. Rocha, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183: 29-37. 2003b.

Ocio, E.M., Maiso, P., Chen, X., Garayoa, M., Álvarez-Fernández, S., San-Segundo, L., Vilanova, D., Lopez-Corral, L., Montero, J.C., Hernandez-Iglesias, T., Alava, H., Galmarini, C., Aviles, P., Cuevas, C., San-Miguel, J.F., Pandiella, A. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma double-strand breaks activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA. *Blood* 113(16): 3781-91. 2009.

Papac, R.J. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 74: 391-398. 2001.

Parkin, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543. 2001.

Pegg, A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462:83–100. 2000.

Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Moorsel, C.J.A., Kroep, J.R., Bergman, A.M., Ackland, S.P. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Therap* 87: 227–253. 2000.

PharmaMar, disponível em <<http://www.pharmamar.com/yondelis-spanish.aspx>>, acesso em 02/04/11.

PharmaMar, disponível em <<http://www.pharmamar.com/productos.aspx>>, acesso em 04/04/11.

Philpott, A., Yew, P.R. The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Mol Biotechnol.* 39(1):9-19. 2008.

Pommier, Y., Kohlhagen, G., Bailly, C., Waring, M., Mazumber, A., Kohn, K.W. DNA sequence- and structure-selective alkylation on guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 35: 13303-309. 1996.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H.L., Marchand, C. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 28;17(5):421-33. 2010.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., Bonner, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162–9. 2002.

Riemenschneider, M.J., Hegi, M.E., Reifenberger, G. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Targ Oncol* 5:161–165. 2010.

- Rinehart, K.L., Holt, T.G., Fregeau, N.L., Keifer, P.A., Wilson, G.R., Perun, T.J. Jr., Sakai, R., Thompson, A.G., Stroh, J.G., Shield, L.S., Seigler, D.S. Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources. *J Nat Prod* 53 (4):771–792. 1990.
- Rocca, C.J., Poindessous, V., Soares, D.G., Ouadrani, K.E., Sarasin, A., Guérin, E., de Gramont, A., Henriques, J.A., Escargueil, A.E., Larsen, .AK. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *Biochem Pharmacol* 80(3):335-43. 2010.
- Sakai, R., Rinehart. K.L., Guan. Y., Wang. A.H. Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: Crystal structures and activities in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11456–11460. 1992.
- Salerno, S., Da Settimo, F., Taliani, S., Simorini, F., La Motta, C., Fornaciari, G., Marini, A.M. Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 17(35):4270-90, 2010.
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem* 77:229–57. 2008.
- Santos, D.B., Schiar, V.P.P., Ribeiro, M.C.P., Schwab, R.S., Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Aschner, M., Barbosa, N.B.V. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. *Mutat Res: Gen Toxicol Environ Mut* 676:21-26. 2009.
- Santos, R.A, Takahashi, C.S. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 46(2):671-7. 2008.
- Schoffski , P., Wolter, P., Clement, P., Sciot, R., De Wever, I., Wozniak, A., Stefan, C., Dumez, H. Trabectedin (ET-743): evaluation of its use in advanced soft-tissue sarcoma. *Future Oncol* 3(4): 381-92. 2007.
- Schöffski, P., Taron, M., Jimeno, J., Grosso, F., Sanfilipio, R., Casali, P.G., Cesne, A.L., Jones, R.L., Blay, J.Y., Poveda, A., Maki, R.G., Nieto, A., Tercero, J.C., Rosell, R. Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: A retrospective multicentric study. *Eur J Cancer* 47(7):1006-12. 2011.
- Sciuscio, D., Diserens, A.C., van Dommelen, K., Martinet, D., Jones, G., Janzer, R.C., Pollo, C., Hamou, M.F., Kaina, B., Stupp, R., Levivier, M., Hegi, M.E. Extent and patterns of MGMT promoter methylation in spheres glioblastoma- and respective glioblastoma-derived. *Clin Cancer Res*17:255-266. 2011.
- Scotto, K.W., Johnson, R.A. Transcription of multigrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. *Mol Interv* 1 (2):117-25. 2001.
- Selenius, M., Rundlöf, A.K., Olm, E., Fernandes, A.P., Björnstedt, M. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxid Redox Signal* 12(7):867-80. 2010.
- Shamberger, R.J., Frost, D.V. Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc* 100:682. 1969.

- Silvestris, N., Maiello, E., de Vita, F., Cinieri, S., Santini, D., Russo, A., Tommasi, S., Azzariti, A., Numico, G., Pisconti, S., Petriella, D., Lorusso, V., Millaku, A., Colucci, G. Update on capecitabine alone and in combination regimens in colorectal cancer patients. *Cancer Treat Rev* 36 (S3): S46–S55, 2010.
- Smith, M.L., Kumar, M.A.S. Seleno-L-methionine modulation of nucleotide excision dna repair relevant to cancer prevention and chemotherapy. *Mol Cell Pharmacol* 1(4): 218–221. 2009.
- Soares, D.G., Battistella, A., Rocca, C.J., Matuo, R., Henriques, J.A., Larsen, A.K., Escargueil, A.E. Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase drives both the early and the late DNA damage response to the monofunctional antitumor alkylator S23906. *Biochem J*. 2011.
- Soares, D.G., Escargueil, A.E., Poindessous, V., Sarasin, A., Raymond, E., Bonatto, D., Henriques, J.A.P., Larsen, A.K. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:13062-7. 2007.
- Soares, D.G., Rocca, C.J., Machado, M., Poindessous, V., Ouaret, D., Sarasin, A., Galmarini, C., Henriques, J.A.P., Escargueil, A., Larsen, A.K. The marine-derived product PM01183 shows activity toward platinum-resistant cells and attenuates nucleotide excision repair. *European Journal of Cancer Supplements*, 8 :7: 166-167, abstract 522. 22nd EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics Programme and Abstract Book, 2010.
- Soares, D.G., Poletto, N.P., Bonatto, D., Salvador, M., Schwartzmann, G., Henriques, J.A. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol* 70(1):59-69. 2005.
- Speit, G., Schütz, P., Högel, J., Schmid, O. Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells. *Mutagenesis* 22:387–394. 2007.
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Yoshida, A., Kohlhagen, G., Pommier, Y. Poisoning of human DNA topoisomerase I by ecteinascidin 743, an anticancer drug that selectively alkylates DNA in the minor groove. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7196–7201. 1999.
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., et al. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 7(8):961–6. 2001.
- Tavecchio, M., Simone, M., Erba, E., Chiolo, I., Liberi, G., Foiani, M., D’Incalci, M., Damia, G. Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer* 44 (4):609–18. 2008.
- Tew, K.D. TLK-286: a novel glutathione S-transferase-activated prodrug. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1047-1054. 2005.
- Underhill, C., Toulmonde, M., Bonnefoi, H. A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Ann Oncol* 22(2):268-79. 2011.

- Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol* 84:337–351. 2010.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84. 2007.
- Valoti, G., Nicoletti, M.I., Pellegrino, A., Jimeno, J., Hendriks, H., D’Incalci, M., Faircloth, G., Giavazzi, R. Ecteinascidin-743, a new marine natural product with potent anti-tumor activity on human ovarian carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res* 4:1977– 83. 1998.
- Vincenzi, B., Napolitano, A., Frezza, A.M., Schiavon, G., Santini, D., Tonini, G. Wide-spectrum characterization of Trabectedin: biology, clinical activity and future perspectives. *Pharmacogenomics*, 11(6):865-78. 2010.
- Xu, Y. Price, B.D. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10 (2): 261-267. 2011.
- Wang, J.C. DNA Topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-692, 1996.
- World Health Organization – WHO, disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>> acesso em 02/04/2011.
- Wouters, M.D., van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., Pothof, J. MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. *Mutat Res* 2011.
- Yang, X-L., Wang, A.H-J. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Therap* 83: 181-215. 1999.
- Yin, J., Aviles, P., Lee, W., Ly, C., Guillen, M.J., Munt S, Cuevas C, Faircloth G. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantification of PM00104, a novel antineoplastic agent, in mouse, rat, dog, and human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 689–695. 2005.
- Zhang, J., Peng, D., Lu, H., Liu, Q. Attenuating the toxicity of cisplatin by using selenosulfate with reduced risk of selenium toxicity as compared with selenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:251–259. 2008.
- Zeng, H., Combs, G.F.Jr. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem* 19(1):1-7. 2008.
- Zewail-Foote, M., Li, V.S., Kohn, H., Bearss, D., Guzman, M., Hurley, L.H. The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair dependent toxicities of this antitumor agent. *Chem Biol* 8(11):1033–49. 2001.
- Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5: 263–274. 2005.
- Zewail-Foote, M., Hurley, L.H. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *J Med Chem* 42(14):2493-7. 1999.