

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

**Influência de Mecanismos de Resposta a Danos no DNA na Resistência de  
Células de Leucemia ao Antineoplásico Mitoxantrona**

**FRANCIELE FACCIO BUSATTO**

**PORTO ALEGRE, 2015.**

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

**Influência de Mecanismos de Resposta a Danos no DNA na Resistência de  
Células de Leucemia ao Antineoplásico Mitoxantrona**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

**Franciele Faccio Busatto**

**Orientadora: Dra. Jenifer Saffi**

**PORTO ALEGRE, 2015.**

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Jenifer, pela oportunidade, há quase 4 anos atrás, de entrar no laboratório de Genética Toxicológica, onde iniciei sendo Iniciação Científica, realizei meu TCC da graduação e hoje já termino meu mestrado. Por toda a orientação neste período, ensinamentos científicos e de vida também, que com certeza contribuíram muito para a pessoa que sou hoje e para os meus interesses e anseios pelo futuro.

Agradeço à Jaqueline Rocha, pela amizade e por todos ensinamentos intelectuais e práticos do dia-a-dia de laboratório. À Victoria, que foi e é, com certeza, muito mais do que eu esperava de uma IC, por toda a ajuda neste último ano de mestrado e por seu envolvimento no meu trabalho, mostrando-se sempre muito empenhada para que tudo desse certo, sempre disposta e muitas vezes até mais animada do que eu mesma. Por ter me feito, além de ensinar, aprender muito com essa experiência de orientação de IC.

Agradeço à todos os colegas de laboratório, pela companhia diária, divisão de alegrias, angústias e conquistas. À Paula Manini, que além de colega virou uma grande amiga, me ensinou e me apoiou muito em todo esse período.

À Dinara, por sempre estar disposta a resolver minhas dúvidas, principalmente metodológicas.

Um agradecimento também à Cris, técnica do laboratório, sempre muito organizada e prestativa resolvendo todas as questões burocráticas necessárias para que nossas pesquisas aconteçam.

Aos secretários do PPGBCM, Sílvia e Luciano, pela disponibilidade e agilidade em resolver qualquer dúvida neste período.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Leonardo, por todo o apoio desde antes do início dessa jornada de mestranda, durante e agora no final. Sempre me incentivando e me levantando quando tudo parecia desmoronar. Obrigada pela compreensão da ausência que se fez necessária muitas vezes, e por sempre me cobrar e lembrar de ter foco!

E por fim, agradeço imensamente à minha família, minhas tias Ilisete e Juraci, ao Milton e especialmente à minha Mãe, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem. Sei que muitas vezes essa vida de pós-graduanda que escolhi lhes

parecia um pouco incerta, e agradeço por mesmo assim confiarem em mim e me incentivarem a crescer cada dia mais e mais. Sem vocês nada disso seria possível!

## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Quimioterapia .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Mecanismo de Inibição das Topoisomerases.....	14
<b>1.2 Resistência Tumoral .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Transporte Através da Membrana Plasmática.....	24
1.2.2 Reparação dos Danos no DNA.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>41</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>43</b>
Introduction .....	45
Materials and Methods .....	46
Results.....	51
Discussion.....	61
Acknowledgments.....	66
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>69</b>
<b>5. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Remoção das supertorções no DNA através das topoisomerases I e II.

Figura 2: Mecanismo de ação dos diferentes inibidores de topoisomerases.

Figura 3: Estrutura molecular dos inibidores de topoll.

Figura 4: Ciclo catalítico da enzima topoll em humanos.

Figura 5: Mecanismos celulares envolvidos na Resistência à Múltiplas Drogas (MDR).

Figura 6: Estrutura das proteínas transportadoras ABC.

Figura 7: Panorama geral das lesões e vias de reparo de DNA.

Figura 8: Sequência de eventos que acontecem na via NER.

Figura 9: Sobrevivências após tratamento de 5 dias com MXT e Etoposídeo e 21 dias em recuperação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*ABC transporters – ATP Binding Cassette*  
*ADP – Adenosine Diphosphate*  
*ATM - Ataxia Teleangiectasia-Mutated*  
*ATP – Adenosine Triphosphate*  
*BCRP1 – Breast Cancer Resistance Protein 1*  
*BER – Base Excision Repair*  
*CPD`s – Cyclobutane Pyrimidine Dimers*  
*CS - Cockayne's Syndrome*  
*DNA-Pk - Proteína kinase dependente de DNA*  
*DOX – Doxorubicina*  
*DSB's - Double Strand Breaks*  
*ERO – Espécies Reativas de Oxigênio*  
*FDA - Food and Drug Administration*  
*GGR – Global Genome Repair*  
*HR - Homologous Recombination*  
*ICL`s - Interstrand Crosslinks*  
*MDR – Multidrug Resistance*  
*MDR1 – Multidrug Resistance protein 1*  
*MGMT - Methylguanine Methyltransferase*  
*MMR – Mismatch Repair*  
*MRP1 - Multidrug Resistance-associated Protein 1*  
*MXT – Mitoxantrona*  
*NBD – Nucleotide-binding Domain*  
*NER - Nucleotide Excision Repair*  
*NHEJ - Non Homologous End Joining*  
*qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction*  
*Sítio AP – Sítio Apurínico ou Apirimidínico*  
*SSBs - Single Strand Binding Proteins*  
*TCR – Transcription Coupled Repair*

TLS – *Translesion Synthesis*

TMD – *transmembrane binding domain*

topoI – DNA topoisomerase I

topoII - DNA topoisomerase II

TTD – *Trichothiodystrophy*

XP - *Xeroderma pigmentosum*

## RESUMO

A quimioterapia é uma das principais estratégias no tratamento do câncer. No entanto, muitos tumores apresentam resistência, tornando o tratamento parcial ou totalmente ineficaz. Existem alguns mecanismos que podem estar relacionados ao desenvolvimento desse perfil de resistência, sendo o mais estudado o aumento do efluxo das drogas através de proteínas de membrana celular. Por outro lado, uma alteração nas vias de reparo de DNA também contribui para a resistência tumoral, uma vez que as lesões são removidas antes mesmo de se tornarem citotóxicas para as células, reduzindo assim a efetividade do quimioterápico. Dentre as vias de reparo de DNA, a via do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é uma das mais versáteis, e há estudos que demonstram seu envolvimento em resposta às lesões geradas por antraciclinas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição dos mecanismos de resposta à dano no DNA, bem como da via NER, na resistência à Mitoxantrona (MXT), um análogo de antraciclinas, na linhagem celular de leucemia HL-60/MX2. Para isso, analisou-se a sobrevivência celular, pelo método de exclusão por azul de tripan, o perfil de ciclo celular e a fosforilação da histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), por citometria de fluxo, além da análise de expressão gênica da via NER e proteínas de efluxo por qPCR. Os resultados indicam um perfil de resposta diferente entre a linhagem resistente e a linhagem sensível, observado pelo teste de sobrevivência e pelos diferentes perfis de ciclo celular e fosforilação de H2AX. Além disso, a análise de expressão gênica demonstra um aumento na expressão de genes da via NER, como ERCC1 já antes do tratamento e XPA após os tratamentos, na linhagem resistente. Estes resultados demonstram portanto envolvimento desta via de reparo de DNA na resistência tumoral da linhagem HL-60/MX2.

## ABSTRACT

Chemotherapy is one of the main cancer treatment strategies; however, tumors can show resistance, which makes the treatment partial or totally inefficient. Among the mechanisms that may be related to the resistant profile, the most studied is increased drug efflux through ABC transporter permeases. On the other hand, altered DNA repair pathways may contribute to cancer resistance, since the lesions are removed before they become toxic to cells, which reduces chemotherapy effectiveness. Among DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair (NER) is one of the most versatile, and there are studies showing its involvement in removal of anthracyclines-induced lesions. Thus, our aim was to evaluate the contribution of DNA damage response mechanisms, focusing on NER, to the resistance to Mitoxantrone (MXT), an anthracycline analog, using the mitoxantrone-resistant leukemia cell line HL-60/MX2 as a model. After treatment with MXT and Etoposide (ETO), a topoisomerase II inhibitor, cell survival was assessed by trypan blue exclusion method; cell cycle profile and H2AX histone phosphorylation ( $\gamma$ H2AX) were evaluated by flow cytometry; and gene expression levels of NER and efflux proteins were determined by RT-qPCR. Results indicate a different response between the resistant HL-60/MX2 and the sensitive HL-60 cells, as observed in the survival assay, cell cycle, and H2AX phosphorylation profile. Furthermore, in the resistant cells, RT-qPCR analysis showed an increase in the expression of NER genes, with ERCC1 expression increased before treatments, and XPA after the treatments. Therefore, our results indicate the contribution of NER machinery in the resistance of leukemia cells to Mitoxantrone.

## **1. REFERENCIAL TEÓRICO**

Câncer é um conjunto de doenças que se caracterizam por um crescimento anormal de células. Este crescimento apresenta a tendência de ser descontrolado e agressivo. As células apresentam uma lesão, herdada ou adquirida, no seu DNA que em condições normais seria reparada ou levaria essas células a morte; no entanto, nas células cancerígenas isto não acontece, permitindo que estas passem a se dividir cada vez mais e mais rápido em comparação com as células normais. (AMERICAN CANCER SOCIETY; LUO et al., 2009; POLYAK et al., 2009; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Nas últimas décadas, o câncer ganhou grande dimensão, tornando-se um problema de saúde pública mundial. De acordo com a estimativa de incidência do câncer publicada em 2014 pelo Instituto Nacional do Câncer, para o período de 2014 e 2015 é esperada a ocorrência de 576 mil novos casos de câncer no Brasil, e, até 2030, estima-se cerca de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes decorrentes desta doença em todo o mundo (INCA, 2014).

Se comparado à mortalidade por outras doenças crônicas os avanços no tratamento do câncer não tem sido tão efetivos. No entanto, dentro da própria estatística de mortalidade por câncer no mundo há uma redução significativa, uma vez que cada vez mais tem se investido em prevenção e diagnóstico (DANAELI et al., 2005; SIEGEL et al., 2014). As opções de tratamento do câncer incluem a radioterapia, imunoterapia, terapias-alvo, remoção cirúrgica e transplante, e a quimioterapia, que é uma das mais utilizadas, isolada ou em combinação com as terapias anteriores (AMERICAN CANCER SOCIETY). Na quimioterapia são utilizadas inúmeras drogas que atuam em diferentes alvos celulares (NEIDLE & THURSTON, 2005). Apesar disso, a eficácia deste tipo de tratamento muitas vezes se torna limitada, uma vez que muitos tumores ainda apresentam resistência aos tratamentos quimioterápicos (HOLOHAN et al., 2013).

### ***1.1 Quimioterapia***

O uso da quimioterapia para o tratamento do câncer surgiu no início do século XX, quando o químico Paul Ehrlich começou a desenvolver drogas para tratar

doenças infecciosas. Foi ele quem definiu o termo “quimioterapia” como o uso de agentes químicos (drogas) para o tratamento de doenças (DEVITA & CHU, 2008).

Por um longo período no século passado, a radioterapia e a cirurgia dominaram o campo das terapias contra o câncer, no entanto, a taxa de cura começou a apresentar-se cada vez mais baixa, uma vez que os pacientes desenvolviam também metástases, que não eram atingidas com esse tipo de tratamento localizado. Observou-se então que a combinação da quimioterapia com cirurgia ou radioterapia apresentava um resultado muito mais efetivo na eliminação do tumor, e assim passou-se a combinar a quimioterapia com diferentes abordagens terapêuticas (DEVITA & CHU, 2008). Atualmente, a quimioterapia pode ser utilizada como única alternativa de tratamento, no entanto, é mais frequentemente associada a outras terapias, como remoção cirúrgica e radioterapia. Diz-se então que, quando a quimioterapia reduz o tamanho do tumor antes da cirurgia ou radioterapia trata-se de um tratamento neoadjuvante. Já quando o uso das drogas quimioterápicas é feito após radioterapia ou cirurgia, a fim de destruir as células cancerígenas remanescentes, denomina-se terapia adjuvante (NEIDLE & THURSTON, 2005; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011).

Dentre os quimioterápicos considerados citotóxicos, os agentes alquilantes são amplamente utilizados. São drogas que atuam diretamente no DNA gerando lesões a fim de prevenir a célula tumoral de se reproduzir. Estes compostos atuam em qualquer fase do ciclo celular, ou seja, não são fase-específicos e são utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, como leucemia, linfomas, mieloma múltiplo, sarcoma, câncer de pulmão, mama e ovário. Como danificam o DNA, podem ocasionar danos a longo prazo na medula óssea. Além disso, em alguns casos raros podem eventualmente levar a indução de leucemia aguda, em decorrência do tratamento. No entanto, este risco é dose dependente, ou seja quanto menor a dose menor o risco, e vice-versa (AMERICAN CANCER SOCIETY; BORDIN et al., 2013). Existem diferentes classes de agentes alquilantes, tais como: mostardas nitrogenadas, nitrosuréias, sulfonatos de alquila e triazinas. Além destes, os agentes platinados são muitas vezes agrupados aos agentes alquilantes, já que possuem um mecanismo de ação semelhante. Enquanto os agentes alquilantes atuam transferindo um grupamento alquil à molécula de DNA, os platinados transferem o grupamento platino. Essas reações caracterizam-se por substituições nucleofílicas no DNA, o qual, quando modificado, interfere com processos essenciais

para as células cancerígenas, como replicação e síntese de proteínas (BORDIN et al., 2013).

Há ainda quimioterápicos classificados como antimetabólitos, os quais atuam inibindo processos biosintéticos essenciais, como a enzima timidilato sintase. Além disso, constituem uma classe de drogas que interferem no DNA e no RNA, uma vez que atuam como análogos de bases substituindo uma das bases nitrogenadas que seria adicionada na síntese. Isto leva a DNA polimerase a adicionar erroneamente um destes compostos, o que posteriormente será tóxico para a célula. Sendo assim, são drogas que atuam especificamente na fase S do ciclo celular, na qual ocorre a síntese das novas fitas de DNA. São comumente utilizadas no tratamento de leucemias, câncer de mama, ovário e trato intestinal, entre outros. Alguns exemplos de antimetabólitos são o 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina, Fludarabina, Metotrexato, Gencitabina, Citarabina, Hidroxiuréia, entre outros (AMERICAN CANCER SOCIETY; LONGLEY et al., 2003; CHU et al., 2015).

Outra classe de fármacos capazes de interferir com o ciclo celular são os inibidores mitóticos. Frequentemente, os alcaloides de plantas ou outros compostos derivados de produtos naturais são capazes de parar a mitose ou inibir as enzimas envolvidas na síntese das proteínas necessárias para a reprodução celular. Os principais alvos desses fármacos são os microtúbulos e filamentos de actina, sendo impedida a formação do fuso mitótico e levando portanto a célula a apoptose. Estas drogas atuam durante a fase M do ciclo celular, mas também são capazes de danificar as células em todas as fases. São utilizadas no tratamento de diferentes tipos de câncer incluindo mama, pulmão, mielomas, linfomas e leucemias. Além disso, são conhecidas pelo seu potencial de causar dano nos nervos periféricos, o que pode ser um efeito colateral dose-limitante. Alguns exemplos de inibidores mitóticos são os taxanos e os alcaloides da vinca (JORDAN & WILSON, 2004; SCHMIDT & BASTIANS, 2007)

Existem também agentes considerados antibióticos antitumorais, os quais são isolados de bactérias. Há ainda duas classificações dentro desta classe de antibióticos: os antibióticos antitumorais não-antraciclina e as antraciclina. Os primeiros têm como mecanismo de ação a formação de pontes entre as fitas de DNA (ICL's do inglês – *interstrand crosslinks*), e, ao contrário das antraciclina, não se intercalam na dupla-hélice. Os principais são a Mitomicina C, Bleomicina e Actinomicina D (AMERICAN CANCER SOCIETY; GALM et al., 2005; CHU et al.,

2015). As antraciclina por sua vez, são antibióticos anti-tumorais que atuam como agentes intercalantes de DNA e interferem com as enzimas envolvidas na sua replicação. São antineoplásicos amplamente utilizados no tratamento quimioterápico e, após a aprovação pelo FDA (do inglês - *Food and Drug Administration*) desta classe de quimioterápicos e anos de uso, identificou-se um novo alvo para a maioria das antraciclina, a enzima DNA topoisomerase II (topoII). Sendo assim, muitas antraciclina enquadram-se também na classe de quimioterápicos inibidores de topoisomerasas, sendo este considerado seu principal mecanismo de ação (MINOTTI et al., 2004; YANG et al., 2015).

### **1.1.1 Mecanismo de Inibição das Topoisomerasas**

As enzimas DNA topoisomerasas desempenham um papel fundamental em praticamente todos os aspectos do metabolismo e da estrutura do DNA, modificando o seu estado topológico, através da quebra e posterior religação de suas fitas, evitando assim a supertorção decorrente do processo de transcrição e replicação. Em mamíferos, esta enzima está presente em duas formas: a topoisomerase I (topoI) e a topoII. Conforme pode ser visualizado na figura 1, a topoI atua no relaxamento desta supertorção principalmente através da quebra de uma ligação fosfodiéster em apenas uma fita do DNA, formando o complexo clivável DNA-topoI. A topoII atua clivando as duas fitas do DNA, formando então o complexo clivável DNA-topoII; sendo que esta também apresenta um papel na mitose, estando envolvida na condensação dos cromossomos e na manutenção da estrutura da cromatina, o que a torna essencial para a célula (NITISS, 2009; POMMIER et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

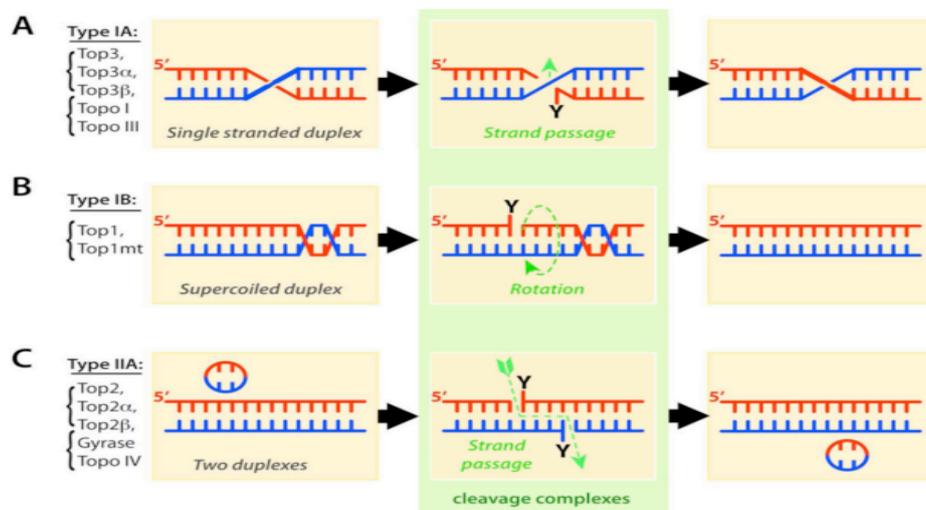


Figura 1: Representação das diferentes formas de remoção das supertorções no DNA através das topoisomerases I e II. Em A e B as topoisomerases do tipo I clivam apenas uma das fitas do DNA para a passagem através da outra fita. Em C a topoisomerase do tipo II cliva as duas fitas do DNA permitindo que a distorção da dupla-fita seja feita por uma rotação entre as fitas ou também por uma passagem de uma pela outra. Fonte: POMMIER, 2013.

Além dos seus diferentes mecanismos de ação, as antraciclinas também atuam inibindo a enzima topoll, no entanto, existem drogas que apresentam essa inibição como único mecanismo. De qualquer maneira, todas as drogas que apresentam esta característica interferem com as topoisomerases e são utilizadas no tratamento de leucemias, câncer de pulmão, mama, ovário, gastrointestinal, entre outros.

Os inibidores das enzimas topoisomerases são extremamente seletivos e não apresentam ambiguidade nas suas terapias-alvo. Dentre os fármacos desta classe clinicamente relevantes, os inibidores da topol não afetam a topoll e vice-versa. Além disso, os antibióticos, inibidores das topoisomerases bacterianas (girase e topoIV), apresentam-se inativos contra as topoisomerases da célula hospedeira, apresentando assim um grande potencial antibacteriano sem impacto no genoma do hospedeiro (POMMIER, 2013).

Os mecanismos de ação dos inibidores de topoisomerases podem ser divididos em: envenenamento da enzima e inibição catalítica da enzima (figura 2). O conceito de envenenamento surgiu, primeiramente, através dos fármacos antibióticos inibidores de topoisomerases, e, foi demonstrado para os agentes

anticancer logo após a descoberta da topol como alvo da Camptotecina, que é o principal inibidor de topol (HSIANG et al, 1985; POMMIER, 2013). Os inibidores classificados como venenos das topoisomerases levam a um aumento nos níveis dos complexos cliváveis de DNA com a enzima. É devido ao fato de estes agentes induzirem a formação de quebras na cadeia de DNA e de proteínas covalentemente ligadas ao DNA, que receberam o nome de venenos da topoisomerase. A segunda classe caracteriza-se pela inibição da atividade catalítica da enzima, sem gerar aumentos nos níveis dos complexos DNA-topo. Os agentes desta classe atuam competindo com o DNA pelo sítio ativo da enzima, levando portanto à morte celular através da eliminação da atividade enzimática, a qual é essencial, e, por isso, são denominados inibidores catalíticos da topoisomerase (NITISS, 2009; POMMIER et al., 2010).

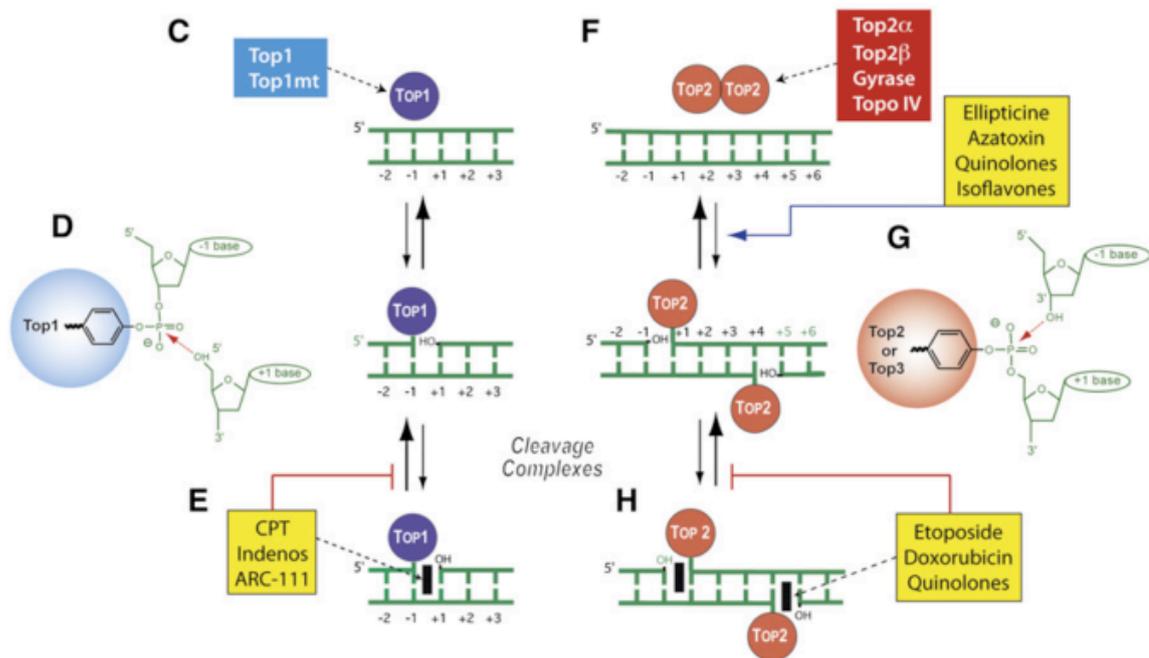


Figura 2: Representação do mecanismo de ação dos diferentes inibidores de topoisomerases. Alguns inibidores da topol podem atuar no início do ciclo catalítico da enzima, impedindo sua ligação com a fita de DNA (etapa G), estes são os inibidores catalíticos da enzima. Enquanto que os outros, venenos de topol, ligam-se ao complexo clivável de DNA-topo, impedindo que a enzima realize a religação das fitas de DNA (etapa H). Esta também é a fase onde atuam os inibidores da topol, como a Camptotecina e seus derivados, conforme demonstrado no painel esquerdo da figura na etapa E. Fonte: POMMIER et al, 2010.

#### 1.1.1.1 Inibidores de topoisomerase I

Dentre as drogas que inibem a topol, somente a Camptotecina e seus derivados são aprovados pelo FDA atualmente. São derivados semi-sintéticos do alcaloide camptotecina da planta *Camptotheca acuminata*, e a identificação da topol como alvo ocorreu apenas 20 anos após o seu uso como droga anticâncer (POMMIER, 2009; POMMIER, 2013). Um dos derivados da Camptotecina que já está em uso é o Topotecan, o qual é prescrito para câncer de ovário e câncer de pulmão de pequenas células recorrente. Outro derivado já aprovado pelo FDA é o Irinotecan, recomendado principalmente para câncer coloretal. Este fármaco é uma pró-droga, que precisa ser convertida no seu metabólito metabolicamente ativo SN-38 para apresentar efeito (POMMIER, 2009; POMMIER et al., 2010; POMMIER, 2013).

#### 1.1.1.2 Inibidores de topoisomerase II

Diferentemente dos inibidores de topol, existem mais classes de inibidores da enzima topoll. Os mais utilizados na clínica são os classificados como venenos de topoll e seus principais representantes seriam o Etoposídeo (ETO) e as antraciclinas e seus análogos. Estes agentes aumentam os níveis dos complexos cliváveis DNA-topoll, uma vez que se ligam a este complexo impedindo que ocorra a religação das fitas quebradas. O processamento destes complexos acaba gerando lesões no DNA que levarão a célula tumoral à morte (FORTUNE & OSHEROFF, 2000; WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; BALDWIN & OSHEROFF, 2005; MCCLENDON & OSHEROFF, 2007).

O ETO está entre as primeiras drogas anticâncer que foram identificadas como inibidores de topoll. É derivado de uma podofilotoxina e atualmente é a droga mais seletiva em termos de inibição de topoll, uma vez que não atua como um agente intercalante, o que faz com que seu único mecanismo de ação seja a formação dos complexos cliváveis DNA-topoll (BALDWIN & OSHEROFF, 2005; POMMIER, 2013; NAJAR & JOHRI, 2014). É usado rotineiramente como primeira

linha de quimioterapia combinada para câncer testicular, câncer de pulmão de pequenas células e linfoma não-Hodking (NAJAR & JOHRI, 2014).

A primeira antraciclina descoberta foi na década de 1950, através do isolamento da Daunorubicina a partir da bactéria *Streptomyces peucetius*, porém, hoje em dia, a Doxorubicina (DOX), que foi descoberta na década seguinte, é a mais utilizada. Ambas são recomendadas para o tratamento de câncer de mama, ossos, sarcoma de tecidos moles, bexiga, linfomas e mielomas múltiplos (BINASCHI et al., 2001; MINOTTI et al., 2004). Todas as antraciclinas consistem de um anel aglicona acoplado a um amino-açúcar que pode intercalar-se no DNA (BLASIAK et al., 2002) (Figura 3).

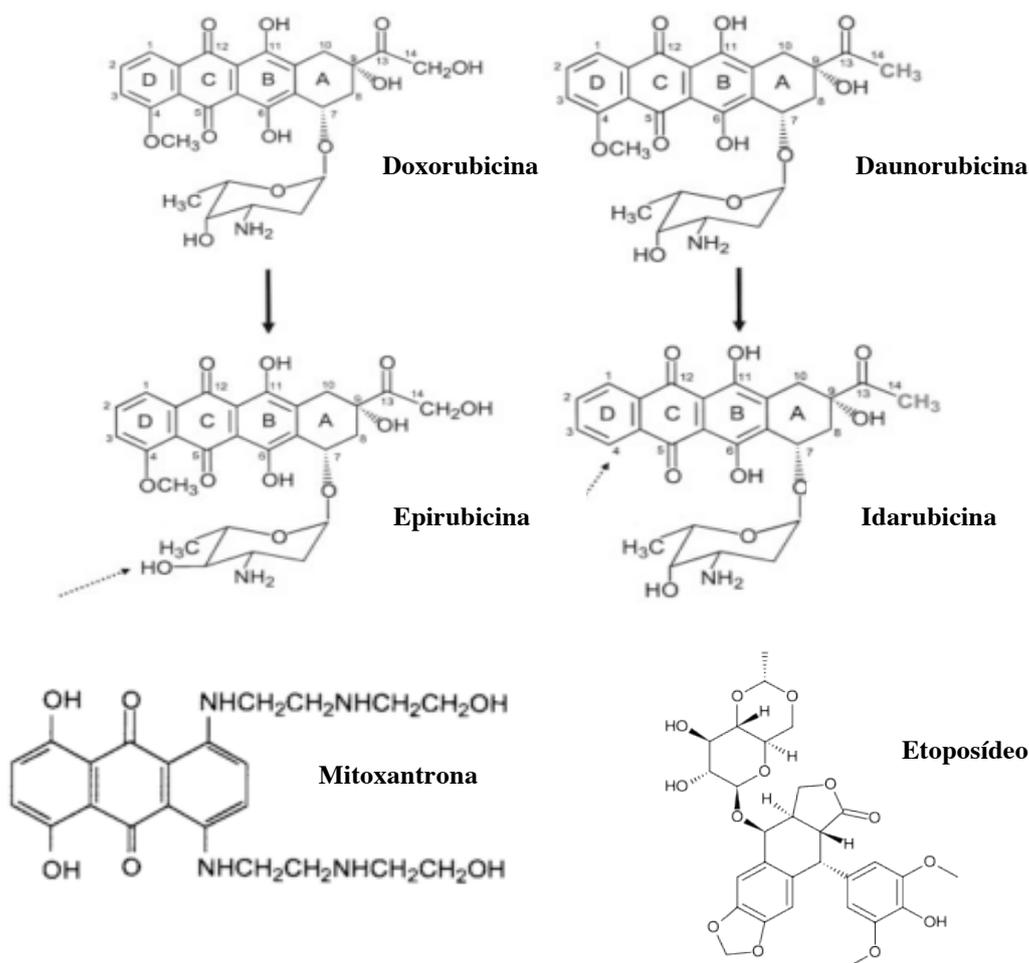


Figura 3: Estrutura molecular dos inibidores de topoll. As antraciclinas Doxorubicina e Daunorubicina, com seus respectivos derivados semissintéticos Epirubicina e Idarubicina, e o análogo sintético Mitoxantrona. E a estrutura do Etoposídeo, uma podofilotoxina. Adaptado de MINOTTI et al., 2004.

Embora os efeitos anticarcinogênicos das antraciclinas sejam mediados principalmente pela inibição da transcrição e replicação do DNA, também produzem radicais livres derivados de oxigênio. Estes radicais livres causam danos diretos às proteínas, aos lipídios e ao DNA, e evidências sugerem que o conhecido poder cardiotoxícico dessas drogas, que causa a apoptose do cardiomiócito, está relacionado ao estresse oxidativo causado por esses processos (SMITH et al., 2010).

Devido a esse grande poder cardiotoxícico, diversos análogos da DOX foram desenvolvidos nas últimas décadas, dentre estes está a Mitoxantrona (MXT). A MXT é um antineoplásico sintético que pertence à classe das antracenodionas. A diferença desta classe de medicamentos para as antraciclinas é que nas antracenodionas não se encontram a porção do amino-açúcar e os anéis tetracíclicos presentes nas antraciclinas, porém mantém-se a estrutura planar do anel policíclico aromático, o que permite a intercalação no DNA (DURR, 1984; FAULDS et al., 1981; WHITE & DURR, 1985). Estes antineoplásicos não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular, e apresentam um potencial significativamente reduzido para formar radicais livres em comparação com as antraciclinas. Sendo assim, a MXT é um análogo estrutural das antraciclinas que é muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como leucemias, linfomas não-Hodking e câncer de mama. Acreditava-se que apesar de igual potência citotóxica, a MXT apresentasse menor cardiotoxicidade quando comparada à DOX (AU et al., 1981; FAULDS et al., 1981; DURR, 1984; WHITE & DURR, 1985; CHUGUN et al., 2008). No entanto, evidências recentes têm mostrado que a MXT também é capaz de induzir uma cardiotoxicidade a longo prazo e que os seus metabólitos, produtos da sua bioativação, também podem estar envolvidos nesses efeitos colaterais cardíacos, já que a cardiotoxicidade foi parcialmente prevenida quando houve inibição do metabolismo mediado por CYP450 e CYP2E1 em um modelo celular de cardiomioblastos (ROSSATO et al., 2013). Ainda para explicar a cardiotoxicidade da MXT, ROSSATO et al., 2014a mostraram a relevância da toxicidade mitocondrial induzida por esta droga. Foi mostrado que o tratamento com MXT leva à formação de mitocôndrias aberrantes e interfere com a funcionalidade mitocondrial *in vivo*, gerando um desbalanço na função mitocondrial que resulta em uma depleção tardia de ATP e, conseqüentemente, em uma falha cardíaca. Após a depleção do seu conteúdo energético, a *performance* cardíaca é prejudicada

(ROSSATO et al., 2014a). Além de toxicidade cardíaca, já se verificou também hepato e hematotoxicidade dos tratamentos com MXT (ROSSATO et al., 2014b).

A citotoxicidade da MXT é devida ainda à sua capacidade de gerar adutos e pontes intercadeias de DNA, além de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem ser geradas devido à presença de anéis insaturados que permitem a incorporação em excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos (PARKER et al., 1999; SKLADANOWSKI et al., 2000; HUANG et al., 2006). Todas estas lesões, incluindo as geradas pela inibição da topoll, são capazes de levar à formação de quebras duplas de cadeia (DSB's do inglês - *Double Strand Breaks*), que é o tipo mais perigoso de lesão cromossomal, podendo resultar em morte celular e rearranjos genômicos (HOEJIMAKERS, 2001; SHIRAVASTAV et al., 2008).

Outro derivado semissintético da DOX é a Epirubicina. Esta droga é mais recente, uma vez que teve sua aprovação pelo FDA somente em 1999. Uma mudança de posição do grupamento hidroxil no carbono 4 da DOX confere à Epirubicina algumas propriedades farmacocinéticas e metabólicas, como um aumento no seu volume de distribuição e uma redução da meia-vida sem alterar o seu mecanismo de ação e espectro de atividade em comparação à DOX (MADDURI et al., 1998; MINOTTI et al., 2004; POMMIER, 2013). Esta droga é utilizada no tratamento de câncer de mama, esôfago e câncer gástrico (POMMIER, 2013). A partir da Daunorubicina também se obteve um análogo sintético, a Idarubicina. Esta é ativa contra leucemia mielóide aguda, mieloma múltiplo, linfoma não-Hodking e câncer de mama. Em comparação com a Daunorubicina, este derivado apresenta um espectro de atividade maior, o qual pode ser atribuído a sua maior lipofilicidade e captação celular, bem como a uma melhor estabilização de um tipo de lesão formada por esta droga que é um complexo do quimioterápico com a droga e a enzima topoll (BORCHMANN et al., 1997; POMMIER, 2013).

Um importante efeito colateral dos venenos da topoll é a formação de neoplasias secundárias que podem surgir a partir de translocações induzidas pela droga, sendo que a isoforma  $\beta$  da topoll seria a responsável por tais neoplasias. Vários estudos demonstraram que as antraciclinas que atuam na topoll $\beta$  contribuem para a cardiotoxicidade, ou seja, seria de grande importância o desenvolvimento de drogas que fossem específicas para a topoll $\alpha$ , as quais reduziriam o risco das

neoplasias secundárias (AZAROVA et al., 2007; NITISS, 2009; POMMIER et al., 2010).

Como demonstrado na figura 4, os venenos da topoll diferem um dos outros: alguns atuam inibindo a religação da dupla-fita no complexo DNA-topoll, como o Etoposídeo e as antraciclinas em geral, enquanto que outros atuam induzindo a sua formação, como as quinolonas. É importante ressaltar que algumas drogas atuam em diferentes etapas do ciclo da enzima topoll, dependendo da sua concentração. A DOX, por exemplo, quando em concentrações baixas atua como um Veneno da topoll induzindo a parada do ciclo na formação dos complexos DNA-topoll, enquanto que em altas concentrações tem atuação semelhante à dos inibidores catalíticos, suprimindo a formação dos mesmos complexos (NITISS, 2009).

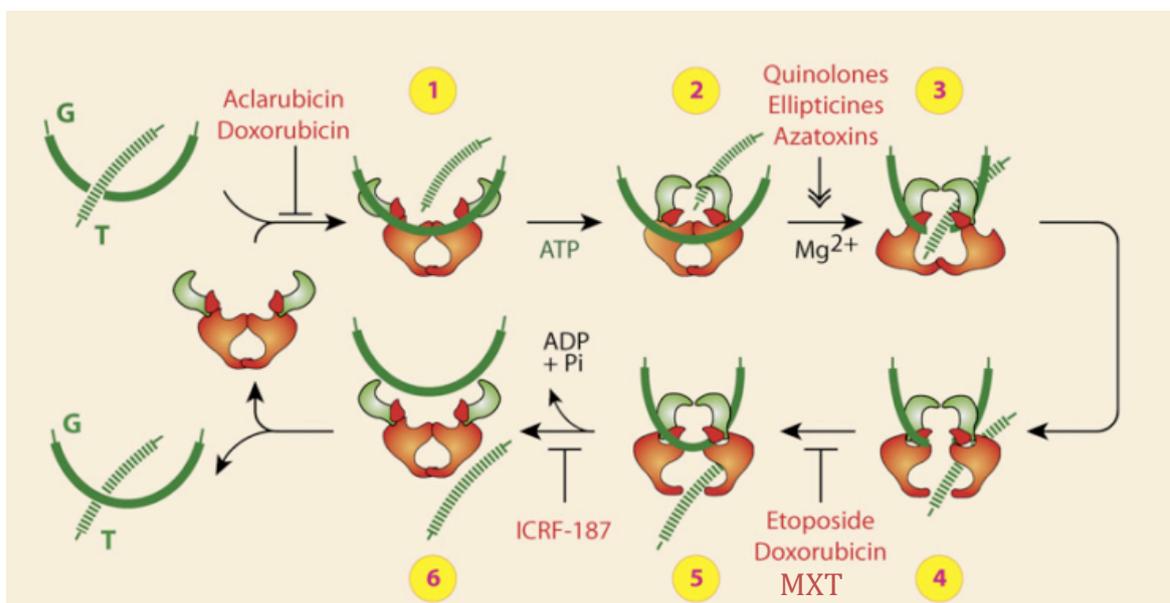


Figura 4: Representação do ciclo catalítico da enzima topoll em humanos. (1) Etapa de ligação da topoll com o DNA; (2) Clivagem da dupla-fita de DNA pela enzima; (3 e 4) Formação dos complexos DNA-topoll; (5) Etapa de religação das fitas de DNA clivadas; (6) Desassociação da topoll do DNA. Fonte: adaptado de POMMIER et al., 2010.

Uma das etapas que estas drogas inibidoras da topoll interferem portanto, e onde se encaixa também a MXT que não está representada na figura, é a reação de religação da quebra no DNA causada pela enzima, através da estabilização dos complexos cliváveis DNA-topoll (representados na figura 4 pelas etapas 4 e 5) (LIU, 1989). A geração de altos níveis destes complexos tem profundos efeitos na fisiologia celular, bloqueando efetivamente a replicação e transcrição do DNA. O seu

processamento, por sua vez, leva à formação de quebras simples e duplas de cadeia e as células subsequentemente entram em apoptose (HOWARD et al., 1994; KAUFMANN, 1998). Pouco se sabe sobre o reparo do complexo DNA-topoII em si, os estudos em geral focam apenas no reparo das lesões ocasionadas a partir do seu processamento (POMMIER et al., 2010).

## **1.2 Resistência Tumoral**

A resistência às drogas é um fenômeno bem conhecido, resultado de quando as doenças se tornam tolerantes aos tratamentos farmacológicos. Este conceito foi considerado pela primeira vez quando algumas bactérias se tornaram resistentes a certos antibióticos, o que se tornou um desafio no tratamento de tais infecções. Desde então, mecanismos similares tem sido encontrados em diferentes tipos de doenças, incluindo o câncer. Embora muitos tipos de tumores sejam inicialmente resistentes aos quimioterápicos, com o tempo podem desenvolver resistência por diferentes mecanismos (HOUSMAN et al., 2014).

A resistência tumoral à quimioterapia, portanto, pode ser dividida em duas classificações: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca acontece quando os fatores que conferem esta característica de resistência já existem nas células tumorais antes mesmo destas serem expostas ao tratamento quimioterápico. Já a resistência adquirida é desenvolvida durante o tratamento de tumores que inicialmente demonstravam-se sensíveis aos quimioterápicos, podendo ser através de mutações adquiridas ao longo deste tratamento, bem como por meio de diversas outras respostas adaptativas das células tumorais. Além disso, já se sabe que tumores podem apresentar uma alta heterogeneidade molecular, portanto a resistência pode surgir através de uma seleção, induzida pela terapia, de uma subpopulação menor presente na massa de células tumorais (HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK et al., 2013). As células cancerígenas podem se tornar resistentes a uma única droga quimioterápica ou a uma classe de drogas com mecanismos de ação similares, através da alteração dos alvos celulares ou por aumento do reparo das lesões induzidas pelas drogas, que geralmente atingem o DNA. Após o fenômeno de seleção para a resistência a uma única droga, as células podem ainda apresentar uma resistência cruzada a outras drogas com estruturas

diferentes e mecanismos de ação não relacionados; a este fenômeno denomina-se Resistência a Múltiplas Drogas (MDR – do inglês *Multidrug Resistance*). Isto pode explicar o porquê de alguns regimes de tratamento que combinam múltiplos agentes com diferentes alvos não apresentarem, muitas vezes, uma resposta satisfatória (GOTTESMAN et al., 2002).

Existem algumas características (representadas na figura 5) apontadas como principais na mediação da MDR, tais como: transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzima-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose (UGHACHUKWU & UNEKWE, 2012; HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK et al., 2013; HOUSMAN et al., 2014). Destas, a mais estudada atualmente é o transporte da droga através da membrana plasmática, no entanto, o aumento da reparação de danos no DNA também é um importante alvo de estudo, uma vez que a maior parte dos quimioterápicos citotóxicos tem como alvo o DNA (HOUSMAN et al., 2014).

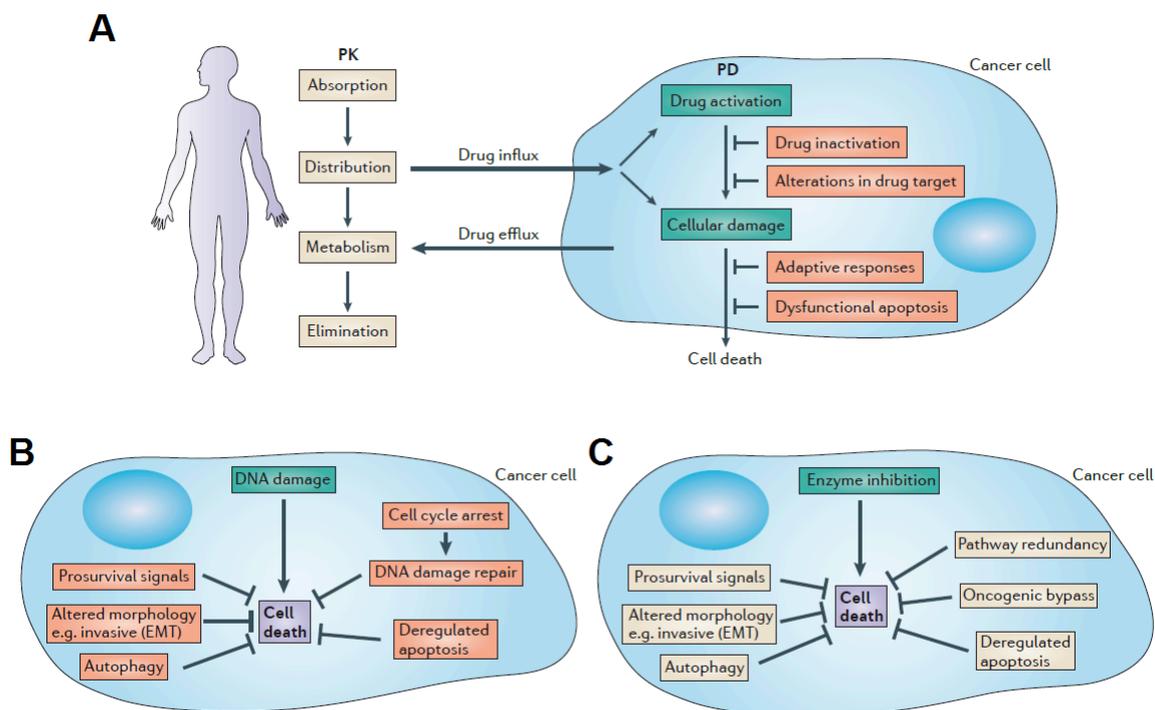


Figura 5: Mecanismos celulares envolvidos na Resistência à Múltiplas Drogas (MDR). Em A estão representados fatores farmacocinéticos, como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos. Os mecanismos de influxo e efluxo de drogas das células também podem limitar a sua atividade nas células tumorais. Em B e C estão representados mecanismos de ação dos quimioterápicos que teriam como objetivo à morte celular, como a indução de danos no DNA ou a inibição enzimática, respectivamente. Uma vez que ocorram alterações em vias como reparo de danos no DNA, autofagia, apoptose ou alteração nas enzimas-alvo dos quimioterápicos as células passam a apresentar resistência à terapia. Fonte: adaptado de HOLOHAN et al., 2013.

### 1.2.1 Transporte Através da Membrana Plasmática

Um dos mecanismos mais proeminentes envolvendo a MDR é a superexpressão de proteínas conhecidas como transportadoras ABC (do inglês *ABC transporters – ATP binding cassette*). Estas proteínas estão presentes em procariotos e eucariotos e caracterizam-se por realizarem um transporte ativo na membrana celular, em que acabam atuando como bombas de efluxo bombeando para fora da célula determinadas substâncias (GLAVINAS et al., 2004; SHUKLA et al., 2008; WU et al., 2011; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). Estes transportadores utilizam energia derivada da hidrólise do ATP (do inglês - *adenosine triphosphate*) à ADP (do inglês - *adenosine bisphosphate*) para transportar seus substratos através da membrana, contra um gradiente de concentração, limitando assim o acúmulo intracelular dos seus substratos (BORTHS et al., 2002; LOCHER, 2004; LOCHER & BORTHS, 2004; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). Existem muitos estudos que indicam que as proteínas transportadoras ABC estão envolvidas no efluxo de moléculas endógenas tóxicas e xenobióticos para fora da célula (ASSARAF et al., 1994; HOOIJBERG et al., 1999; ASSARAF, 2007; HOLLAND, 2011). Além disso, também estão envolvidas no transporte de importantes substratos através das membranas intra e extracelulares, como aminoácidos, colesterol e seus derivados, açúcares, vitaminas, peptídeos, lipídeos, algumas proteínas importantes, drogas hidrofóbicas e antibióticos (GOLDSTEIN et al., 1989; GOTTESMAN & AMBUDKAR, 2001; IFERGAN et al., 2004; DEAN & ANNILO, 2005; SHI et al., 2007; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Estruturalmente, as proteínas transportadoras ABC apresentam dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs – do inglês *nucleotide-binding domains*) e dois domínios de ligação transmembrana (TMDs – do inglês *transmembrane binding domain*) (TIWARI et al., 2011; WU et al., 2001; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). É nas porções NBDs que acontece a ligação do ATP a ser hidrolisado para que ocorra o evento de bombeamento. Essas porções também são responsáveis pela ligação e bombeamento para fora da célula de xenobióticos e/ou substratos fisiológicos, (KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). Os domínios NBDs possuem três motivos conservados: walker A e walker B, encontrados em todas as proteínas que ligam ATP, e uma assinatura de motivo C, a qual é

específica aos transportadores ABC e os distingue das demais proteínas de ligação ao ATP (SILVA et al., 2015). Já as regiões transmembrana, ou domínios TMDs, ligam os substratos de drogas hidrofóbicas que são tanto neutros quanto positivamente carregados, e são provavelmente apresentadas ao transportador através da bicamada lipídica (KATHAWALA et al., 2014).

São necessários dois eventos de hidrólise de ATP, os quais não precisam ocorrer simultaneamente, para transportar uma única molécula (SENIOR & BHAGAT, 1998; GOTTESMAN et al., 2002). Em síntese, a ligação do substrato às regiões transmembrana estimula a atividade de ATPase da proteína, causando uma mudança conformacional na molécula, que libera o substrato tanto para o folheto externo da membrana (podendo assim se difundir ao meio), quanto para o espaço extracelular. A hidrólise do segundo ATP parece ser necessária para redefinir o transportador, de modo que volte a sua conformação inicial podendo então ligar novamente outro substrato, completando assim um ciclo catalítico (Sauna and Ambudkar, 2000; Gottesman et al, 2002).

Atualmente já foram isolados e identificados 49 membros da família de transportadores ABC, sendo que esta é ainda subdividida em 7 subfamílias, ABCA a ABCG. As proteínas da família ABC mais relacionadas com MDR são conhecidas como Glicoproteína-P (gene *ABCB1*), MRP1 (gene *ABCC1*) e BCRP1 (gene *ABCG2*), e estão, muitas vezes, superexpressas em tumores (LESLIE et al., 2005; DE GORTER et al., 2012).

#### 1.2.1.1 Glicoproteína P (*ABCB1*)

A proteína humana glicoproteína P, também conhecida como MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), é codificada pelo produto do gene *ABCB1* localizado no cromossomo 7p21, e foi a primeira proteína da classe dos transportadores ABC a ser identificada (JULIANO & LING, 1976; UEDA et al, 1986; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). Apresenta um peso molecular de 170kDa e está localizada na porção apical de membranas transportadoras de determinadas células, onde atua protegendo-as de xenobióticos e toxinas celulares (ASSARAF & BORGNIA, 1993; SAUNA & AMBUDKAR, 2000; GOTTESMAN et al., 2002; SARKADI et al., 2006; KATHAWALA et al., 2014; SILVA et al., 2015). A

superexpressão de glicoproteína P confere uma resistência significativa a uma ampla variedade de quimioterápicos como taxanos (Ex. Paclitaxel, Docetaxel), epidofilotoxinas (Ex. Etoposídeo, Teniposídeo), alcaloides da vinca (Ex. Vincristina, Vimblastina), antraciclinas (Ex. DOX, Daunorubicina), entre outros (GOTTESMAN et al., 2002; SCHINKEL & JONKER, 2003; TIWARI et al., 2011; DE GORTER et al., 2012; SODANI et al., 2012; KATHAWALA et al., 2014).

#### 1.2.1.2 MRP1 (ABCC1)

A proteína MRP1 (do inglês - *Multidrug resistance-associated protein 1*) é codificada pelo gene *ABCC1* e foi primeiramente identificada nas linhagens celulares H69AR e HL60/Adr, ambas resistentes a antraciclinas (COLE et al., 1992; BAKOS et al., 1998; KRUH & BELINSKY, 2003). Seu peso molecular é de 190kDa e está presente na superfície basolateral do epitélio de membrana de algumas células, atuando de forma a promover o efluxo de várias substâncias endógenas e exógenas (BAKOS et al., 1998; KRUH & BELINSKY, 2003; KATHAWALA et al., 2014). Apesar de apresentar relativamente um baixo grau de identidade na sequência de aminoácidos com a glicoproteína-P (apenas 15%), ambas as proteínas apresentam perfis de resistência muito semelhantes, uma vez que a superexpressão de MRP1 confere resistência a antraciclinas, alcaloides da vinca, epidofilotoxinas, camptotecina, entre outros (ASSARAF et al., 2003; LESCHZINER et al., 2006; SODANI et al., 2012; ANREDDY et al., 2014; KATHAWALA et al., 2014; WANG et al., 2014). No entanto, diferentemente da glicoproteína P, não é observada uma resistência aos taxanos, classe que apresenta maior perfil de resistência na superexpressão de *ABCB1* (COLE et al., 1994; MORROW et al., 2006; KATHAWALA et al., 2014).

#### 1.2.1.3 BCRP1 (ABCG2)

Algumas drogas, como a MXT, não se caracterizam como substrato para as proteínas de resistência MDR1 e MRP1, o que faz com que as células que se apresentam resistentes a este quimioterápico produzam uma proteína mais distante da família ABC, a *ABCG2*. Com um peso de 72kDa, esta proteína também é

conhecida como BCRP (do inglês – *breast cancer resistance protein*) e parece ser a primeira proteína transportadora a apresentar-se na forma de homodímero, com dois “meio-transportadores”, sendo um domínio TMD e um NBD. Cada um contém um domínio de ligação ao ATP na porção amino-terminal da molécula transmembrana que apresenta, neste caso, seis segmentos (DOYLE et al., 1998; MIYAKE et al., 1999; GOTTESMAN et al., 2002; DE GORTER et al., 2012; KATHAWALA et al., 2014). A figura 6 ilustra esta diferença entre a BCRP1 e as demais proteínas ABC. Devido a esta característica que a difere das outras proteínas envolvidas na MDR, a BCRP1 é capaz de sofrer homodimerização ou oligomerização consigo mesma ou com outros transportadores (DE GORTER et al., 2012; KATHAWALA et al., 2014).

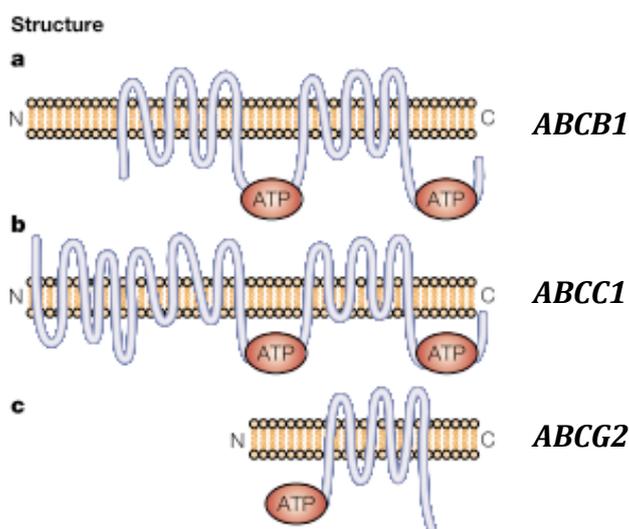


Figura 6: Estrutura das proteínas transportadoras ABC. O domínio intracelular NBD aparece com uma molécula de ATP ligada. A proteína BCRP1, codificada pelo gene *ABCG2*, está representada em C com sua estrutura de homodímero. Adaptado de GOTTESMAN et al., 2001.

### 1.2.2 Reparação dos Danos no DNA

A remoção das lesões no DNA antes destas tornarem-se tóxicas pode reduzir a toxicidade dos antineoplásicos. Desta forma, a eficácia do tratamento do câncer pode ser modulada pelas vias de reparo do DNA (HELLEDAY et al., 2008). De um modo geral, pode-se dizer que a deficiência nos sistemas de reparo está associada a uma maior susceptibilidade aos antineoplásicos. Estes danos no DNA podem ser reparados por vias mecanisticamente distintas, conforme a natureza ou a extensão

da lesão. Considerando-se o mecanismo de ação, é possível destacar três principais vias de reparação de DNA: a reparação direta, a reparação de quebras duplas, que inclui o reparo por recombinação homóloga (HR do inglês – *Homologous Recombination*) e o reparo de junções não homólogas (NHEJ do inglês – *Non Homologous End Joining*) e a reparação por excisão, que inclui as vias de reparo por excisão de bases (BER do inglês – *Base Excision Repair*) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês – *Nucleotide Excision Repair*). Ainda é possível que um dano persista no genoma, e, nesses casos, a maquinaria de replicação é capaz de utilizar o DNA lesionado como molde para uma nova fita, este mecanismo é conhecido como Síntese Translesão (TLS do inglês – *Translesion Synthesis*). Também pode ocorrer um erro de incorporação de bases no processo replicativo, o que ativa o mecanismo de correção de erros de emparelhamento, ou *Mismatch Repair* (MMR) (CHRISTMANN et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013; ERMOLAEVA MA et al., 2015). Por fim, pode-se citar também a via de Fanconi (do inglês - *Fanconi Anemia Pathway*), que atua em processos de sinalização e reparação de danos no DNA, especialmente danos do tipo pontes intercadeias no DNA (ICLs) (KIM & D'ANDREA, 2012; BOGLIOLO et al., 2013; DEANS & WEST, 2013). Na figura 7 é possível visualizar um panorama das diferentes vias de reparo de DNA, bem como as lesões específicas que reconhecem.

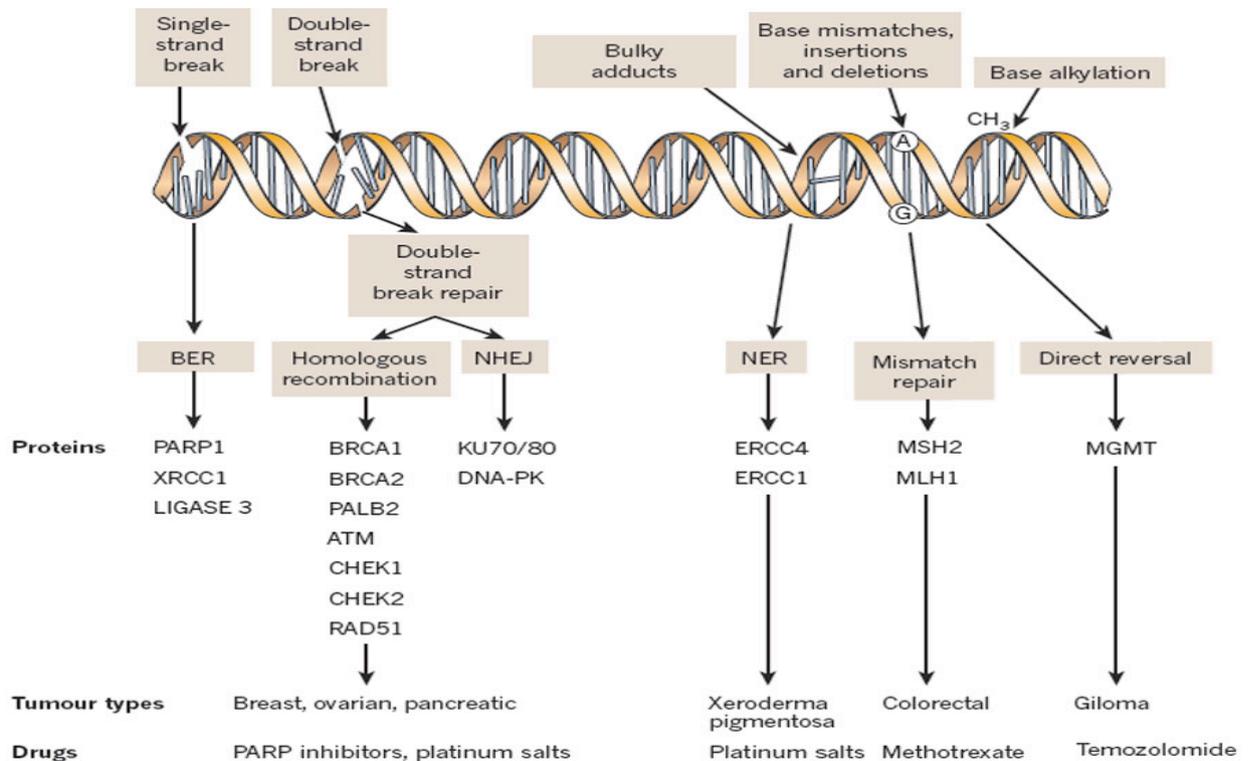


Figura 7: Panorama geral das possíveis lesões formadas ao longo da dupla fita de DNA, vias de reparação de DNA responsáveis pela remoção dessas lesões com suas principais proteínas e tipos tumorais ou doenças em que estão mutadas. Fonte: LORD & ASHWORTH, 2012.

### 1.2.2.1 Reparo Direto

A reparação direta, ou reversão direta dos danos ao DNA, constitui-se de reações catalisadas por um único produto, sendo assim, é tido como o mecanismo mais simples de reparação. É considerado também um processo mais rápido se comparado aos que possuem múltiplas etapas bioquímicas, uma vez que se utiliza de enzimas simples que conseguem reparar as lesões sem que seja necessária a incisão da cadeia açúcar-fosfato do DNA ou a excisão de bases. Portanto, é relativamente mais preciso, devido ao seu elevado grau de especificidade, no entanto apresenta um limitado número de substratos (CHRISTMANN et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013). Existem três tipos de reparo direto, são eles: 1- reparo através da O<sup>6</sup>-metilguanina metiltransferase (MGMT), 2- reparo através de fotoliasas

e 3- reparo através de ligases.

A MGMT é uma enzima que reconhece lesões do tipo metilações de guaninas, como por exemplo a adição de um grupamento metil na posição 6 da guanina gerando a O<sup>6</sup>-metilguanina. Estas lesões são altamente mutagênicas, uma vez que com essa alteração de base a guanina passa a se parear com timina ao invés de citosina. Devido à sua atividade de alquiltransferase, a MGMT transfere esse grupamento metil para um aminoácido próprio, o que a torna inativa. Sendo assim, muitas vezes se diz que a MGMT atua com um mecanismo suicida (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013).

Quando há lesões do tipo dímeros de pirimidinas, como os anéis de ciclobutano (CPDs) ou 6,4-fotoprodutos, induzidas por radiação do tipo UVC é acionado um sistema de fotorestauração, isto é, as enzimas fotoliasas (SAFFI et al., 2003; LI J et al., 2010). São enzimas bem conhecidas presentes em bactérias, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, mas não estão presentes em humanos. Nesse sistema de reparação, a fotoliase se liga ao dano no DNA induzido pela luz UV de uma forma independente de luz, no entanto, para que ocorra a reação de reparo dessa lesão a enzima precisa ser fotoativada, ou seja só é ativa na presença de luz. As fotoliasas são capazes de reverter ambas as lesões CPDs e 6,4-fotoprodutos (CHRISTMANN et al., 2003; LI J et al., 2010). Nos humanos há outra via que responsável pela remoção desse tipo de lesão, a via NER, a qual repara através da remoção de nucleotídeos, que será melhor detalhada mais adiante.

Por fim, há ainda a atuação das enzimas DNA ligases nos mecanismos de reparação direta. A enzima DNA Ligase I é capaz de religar as cadeias de DNA que sofreram uma quebra e apresentam em suas extremidades os grupamentos 3'-OH livres. Sendo assim, um grande número de quebras radio induzidas no DNA podem ser reparados rapidamente e com alta fidelidade (SAFFI et al., 2003).

#### 1.2.2.2 Reparo por Erros de Emparelhamento

Também conhecido como *Mismatch Repair* (MMR), é um sistema responsável pela remoção de bases mal pareadas, inserções ou deleções. Apesar da alta fidelidade do processo de replicação do DNA, algumas bases podem sofrer

um emparelhamento incorreto espontaneamente ou ainda por desaminação, oxidação, metilação e erros de replicação. Além disso, o MMR também está envolvido no reparo de bases mal pareadas devido à lesões quimicamente induzidas (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013; BRIDGE et al., 2014). A fim de preservar a integridade do genoma, o MMR deve ocorrer exclusivamente na fita nova que está sendo sintetizada, portanto a discriminação entre esta e a fita molde é essencial. Em procariotos há uma identificação por parte da endonuclease inicial no processo através de metilações presentes na fita molde. Já em eucariotos foi proposto que a identificação da nova fita é através dos fragmentos de Okazaki, que não se encontram na fita molde (NICK MCELHINNY SA et al., 2010; IYAMA & WILSON, 2013).

Pode-se dizer que se constitui um sistema de reparo simples, uma vez que acontece através de poucas etapas, as quais resumidamente são: reconhecimento da região de mal pareamento, discriminação entre a fita molde e a fita que está sendo sintetizada, onde foi inserida a base errada, excisão desta base e síntese da nova base correta (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013; BRIDGE et al., 2014).

### 1.2.2.3 Reparo de Quebras Duplas (DSB`s)

As DSB`s são as lesões mais perigosas que podem atingir o DNA celular, uma vez que se não reparadas, ou reparadas incorretamente, podem resultar em grandes alterações cromossômicas, como deleções, translocações e fusões cromossômicas. Estas alterações aumentam a instabilidade cromossômica e são características comuns em células tumorais. Essas quebras podem surgir através de processos celulares endógenos, como a ação de espécies reativas de oxigênio que são produzidas pelo metabolismo celular ou alguma eventual falha nos processos de replicação do DNA. No entanto, as DSB`s também podem surgir por ação de fontes exógenas à célula, como por exemplo a radiação ionizante ou a ação de diversos agentes quimioterápicos (IYAMA & WILSON, 2013). Existem duas principais vias de reparo responsáveis pela remoção desse tipo de lesão: a recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013; LIU et al., 2014).

O reparo de quebras duplas pela via HR utiliza a cromátide irmã como molde, sendo conhecido assim como reparo livre de erros. De maneira geral, a presença de uma DSB no DNA ativa a proteína kinase ATM (do inglês - *ataxia teleangiectasia-mutated*), a qual atua sinalizando para que toda a maquinaria de resposta à dano entre em ação. Esta via envolve a participação de diferentes proteínas, como BRCA1 e BRCA2, que são clássicas marcadoras para câncer de mama quando mutadas, RAD50, MRE11 e NBS1, que juntas formam o complexo MRN, importante na estabilização das extremidades da fita de DNA que circundam a lesão e na sua excisão, bem como proteínas da Via de Fanconi, que também são recrutadas após a fosforilação da proteína FANCD2 quando a lesão inicial for do tipo ICL. A fita de DNA danificada realiza uma invasão da região de cadeia dupla homóloga e intacta do DNA, sobre a qual é ressintetizada a porção que foi excisada. Devido a essa necessidade da fita homóloga, a HR ocorre apenas nas fases S e G2 do ciclo celular, onde já ocorreu a duplicação do material genético (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; CERBINSKAITE et al., 2012; IYAMA & WILSON, 2013; LIU et al., 2014).

Já a via NHEJ remove as DSB's do genoma simplesmente juntando as terminações do DNA, sem necessidade de homologia entre sequências o que propicia a atuação das proteínas desta via a atuarem na fase G1 do ciclo celular. Esta também é a fase onde a maior parte das células se encontram, ou seja, o reparo via NHEJ acaba sendo o mais predominante dentre as opções de reparo de quebras duplas. Neste mecanismo não há a garantia de que ocorra uma restauração da sequência onde ocorreu a quebra, por isso diz-se que, ao contrário da HR, é um sistema sujeito à erros. Em síntese, logo após a indução da via NHEJ o heterodímero Ku70/80 se liga no DNA e recruta a subunidade catalítica da proteína kinase dependente de DNA (DNA-PKc), a qual desencadeia uma extensa cascata de sinalização que orquestra processos de reparação a jusante na via (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; CERBINSKAITE et al., 2012; IYAMA & WILSON, 2013; LIU et al., 2014).

#### 1.2.2.4 Síntese Translesão

Durante o processo de replicação do DNA, a DNA polimerase replicativa pode se deparar com alguma lesão na fita molde, a qual se não contornada de forma eficaz poderia levar a forquilha de replicação a um colapso. Para que isto não aconteça, as células possuem um mecanismo de reparo chamado síntese translesão (TLS). Trata-se de um processo relativamente simples, onde um grupo especial de polimerases, geralmente as da família Y e B, é capaz de contornar esta lesão, fazendo o chamado “*bypass*”. Na TLS não ocorre a remoção ou reparo da lesão, mas sim apenas um desvio para que o processo de replicação possa ser concluído com sucesso (SAFFI et al., 2003; SALE et al., 2012).

Em contraste com as polimerases replicativas, que sintetizam DNA com alto grau de precisão e são bloqueadas por lesões que distorcem significativamente a sua geometria, as polimerases da TLS são capazes de sintetizar através destas lesões. Isto porque possuem sítios ativos mais abertos, que permitem acomodar esta lesão, no entanto, apresentam uma taxa de erro muito maior do que as polimerases replicativas. Ao se depararem com a lesão na fita molde de DNA, as polimerases replicativas param e ocorre então uma rápida troca por uma polimerase TLS, que apesar de não ser tão fiel é capaz de ultrapassar essa lesão e continuar com a síntese da nova fita, sendo que logo em seguida a troca é desfeita para que a polimerase replicativa possa voltar ao seu papel (SAFFI et al., 2003; SALE et al., 2012).

#### 1.2.2.5 Via de Fanconi

A anemia de Fanconi é uma desordem de instabilidade cromossomal caracterizada por múltiplas anormalidades congênitas, falha progressiva da medula óssea e elevada predisposição ao câncer. É causada por mutações germinativas em genes que cooperam na via de reparo de DNA responsável pela remoção de ICL's que são lesões fatais por bloquearem a replicação e transcrição do DNA. A formação de ICL's é o resultado de uma gama de quimioterápicos, dentre eles cisplatina, mostarda nitrogenada e mitomicina C. Em decorrência da alta incidência de câncer nos pacientes com anemia de Fanconi, se percebeu a elevada

sensibilidade que estes apresentavam aos tratamentos indutores de ICL`s. Sendo assim, foi caracterizada a via de Fanconi como a responsável pela remoção deste tipo de lesão (SU & HUANG, 2011; KIM & D'ANDREA, 2012; DEANS & WEST, 2013).

Existem pelo menos 15 produtos de genes que constituem esta via de reparo responsável pela remoção das ICL`s durante a replicação. Mais especificamente, oito proteínas (FANCA, B, C, E, F, G, L, M) formam um complexo ubiquitina E3 ligase denominado de núcleo de Fanconi. Este complexo, iniciado pela FANCM, ativa o complexo heterodimérico FANCD2-FANCI através de uma monoubiquitinação, sendo que esta é a etapa principal da via e ocorre na fase S do ciclo celular. Desencadeia-se então uma cascata de eventos a fim da remoção do *crosslink* presente no DNA, e, para isso, há o envolvimento de proteínas que estão presentes em outras vias de reparo, como o complexo XPF-ERCC1 que tem função de endonuclease na via NER e atua aqui com o mesmo propósito, clivando uma das fitas de DNA para remover uma porção da ponte intercadeia. O resultado desta primeira clivagem é a formação de uma DSB no DNA, sendo assim há também o envolvimento da via HR para a reparação deste dano gerado no processamento das ICL`s (SU & HUANG, 2011; KIM & D'ANDREA, 2012; DEANS & WEST, 2013). A remoção de ICL envolve a integração entre diferentes vias ou proteínas de diferentes vias.

#### 1.2.2.6 Reparo por Excisão de Bases

O Reparo por Excisão de Bases (BER) reconhece e repara lesões que modificam bases, bem como sítios abásicos e quebras simples no DNA. A maioria, porém não todas, as lesões reparadas pela via BER são lesões oxidativas, produtos de ataques de espécies reativas de oxigênio, as quais muitas vezes apresentam-se em uma taxa de formação muito elevada mesmo na ausência de agentes exógenos, o que indica que o próprio metabolismo celular é capaz de gerar a maioria dessas lesões oxidativas no DNA nuclear (Maynard et al, 2009). Dentre os agentes exógenos que podem formar lesões reparadas pelo BER estão a radiação ionizante e os agentes alquilantes, classe na qual alguns quimioterápicos estão incluídos. Uma das principais lesões oxidativas removidas pela via BER é a 8-oxoguanina,

uma lesão extremamente mutagênica devido a sua alteração na base da guanina que leva a um pareamento errôneo com a adenina (CHRISTMANN et al., 2003; SAFFI et al., 2003; IYAMA & WILSON, 2013).

Em comparação à outras vias de reparo de DNA, pode-se dizer que é um processo multienzimático de reparação relativamente simples. Inicialmente ocorre o reconhecimento e remoção da base danificada por uma classe de enzimas conhecidas como DNA glicosilases, as quais clivam a ligação glicosídica entre a base e o açúcar da estrutura do nucleotídeo, gerando assim um sítio abásico também conhecido como sítio AP (apurínico ou apirimidínico). Estes sítios AP são substratos para uma nova classe de enzimas, as AP endonucleases, que clivam a cadeia de DNA neste local do sítio abásico deixando a fita não danificada livre para servir como molde para que uma DNA polimerase, frequentemente a Pol $\beta$ , possa inserir os novos nucleotídeos ressintetizando a porção que foi removida com a lesão. Por fim, uma enzima DNA ligase termina o processo ligando a nova porção sintetizada à porção da fita de DNA remanescente (CHRISTMANN et al., 2003; MAYNARD et al., 2009; IYAMA & WILSON, 2013; SYKORA et al., 2013).

#### 1.2.2.7 Reparo por Excisão de Nucleotídeos

Dentre as vias de reparação do DNA, o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é uma das mais versáteis, estando envolvido na remoção de lesões que levam a distorções estruturais importantes na cadeia do DNA, como os já mencionados 6,4-fotoprodutos e CPDs, reparados pela reparação direta em organismos inferiores. É um sistema bastante conservado nos organismos eucarióticos, desde a levedura *S. cerevisiae* até células de mamíferos. Em humanos, as deficiências neste processo originam as doenças hereditárias *Xeroderma pigmentosum* (XP), Síndrome de Cockayne (CS do inglês - *Cockayne's Syndrome*) e Tricotiodistrofia (TTD do inglês - *Trichothiodystrophy*). Pacientes que sofrem de alguma dessas doenças autossômicas recessivas são sensíveis à luz solar, sendo que os portadores de XP, do grupo de complementação XPA à XPG, são deficientes na etapa de excisão de danos induzidos por raios ultravioleta e por outros agentes genotóxicos, apresentando uma elevada sensibilidade a esses agentes e uma forte predisposição ao câncer de pele (SARASIN & STARY, 2007; SHUCK et al., 2008;

WOOD, 2010; DIJK et al., 2014; MARTEIJN et al., 2014; MENCK & MUNFORD, 2014).

Em termos de reconhecimento das lesões, o NER pode ser dividido em duas sub-vias de reparação: a reparação global do genoma (GGR do inglês - *Global Genome Repair*), que ocorre em todas as regiões do genoma, independente da transcrição, e a reparação acoplada à transcrição (TCR do inglês - *Transcription Coupled Repair*), que ocorre apenas nas regiões transcritas de genes ativos. Ambas as sub-vias diferem apenas na etapa de reconhecimento da lesão do DNA, e convergem então para uma via em comum de incisão/excisão e correção dos danos gerados e subsequente ligação da fita de DNA (SARASIN & STARY, 2007; SHUCK et al., 2008; WOOD, 2010; KAMILERI et al., 2012; DIJK et al., 2014; MARTEIJN et al., 2014; MENCK & MUNFORD, 2014). Nessas etapas, encontram-se diversas proteínas ou complexos de proteínas que desempenham diferentes papéis, desde o reconhecimento da lesão até o seu reparo, conforme pode ser visualizado na figura 8.

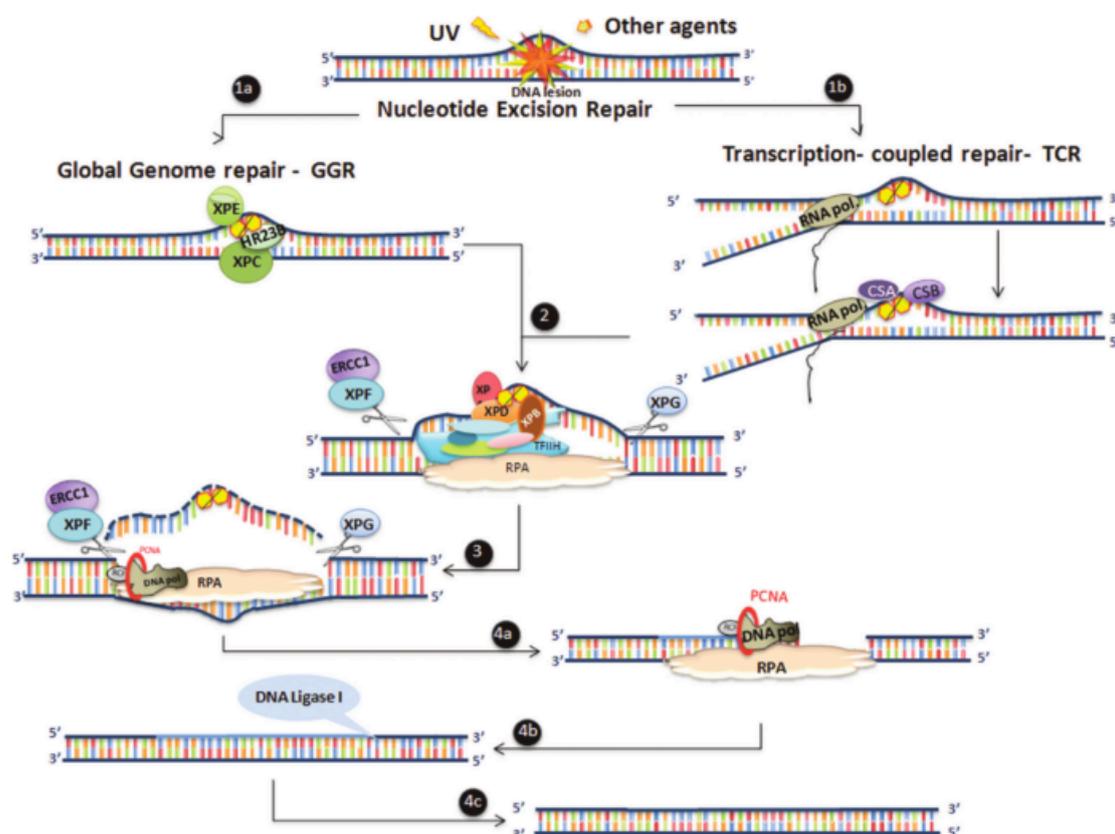


Figura 8: Sequência de eventos que acontecem na via NER, onde em 1a e 1b estão representadas as diferentes vias de reconhecimento da lesão (GGR e TCR, respectivamente), que convergem para a via central a partir de 2 dando continuidade para a sequência de eventos para remoção da porção de nucleotídeos contendo a lesão e síntese da porção excisada. Fonte: MENCK & MUNFORD, 2014.

No reconhecimento via TCR, ocorre uma parada da RNA polimerase no processo de transcrição ao encontrar uma porção do DNA com uma grande distorção em decorrência de algum agente exógeno que ocasionou a lesão. Pode-se ressaltar como principais as proteínas CSA e CSB, que são recrutadas para o local de parada da RNA polimerase, e em seguida sinalizam para o recrutamento de uma série de proteínas e fatores que ajudam a estabilizar a porção da lesão para o posterior processo de incisão e excisão. Já no reconhecimento via GGR, não há um processo transcricional ocorrendo naquelas porções do DNA que sofreram a lesão; aqui uma proteína importante chamada UVSSB é recrutada para a fita que sofreu a distorção com a lesão, em seguida há o recrutamento da proteína XPC na fita oposta, a fim de estabilizá-la, com a ajuda de outros fatores, para os processos posteriores (SARASIN & STARY, 2007; SHUCK et al., 2008; WOOD, 2010; KAMILERI et al., 2012; MARTEIJN et al., 2014; MENCK & MUNFORD, 2014).

A etapa comum a todo o processo do NER, que ocorre após o reconhecimento da lesão, se inicia com a atuação de proteínas com função de helicase, como por exemplo a XPB e a XPD, que atuam abrindo a dupla hélice do DNA para facilitar a remoção da porção lesionada. Logo após esta etapa há a atuação do complexo RPA, composto por proteínas que estabilizam as porções de simples fita do DNA (SSBs do inglês – *single strand binding proteins*), bem como da proteína XPA, que possui um papel único e fundamental na via NER já que é responsável pelo reconhecimento de qual é o tipo de lesão em questão, uma vez que nas sub-vias anteriores apenas há o reconhecimento da lesão. Inicia-se então o processo de incisão a algumas bases de distância da lesão, realizado pelas endonucleases XPF-ERCC1, que faz a incisão na porção 5' da lesão, e XPG, que faz a incisão na porção 3' da lesão. Em seguida ocorre então a excisão de um fragmento de 24 a 32 nucleotídeos contendo a lesão. Esta porção que foi excisada é ressintetizada por uma DNA polimerase, frequentemente a Pol $\delta$ , que utiliza a fita não lesionada como molde. Por fim, uma DNA ligase é responsável pela última ligação fosfodiéster que une o novo fragmento sintetizado à porção da fita remanescente (SARASIN & STARY, 2007; SHUCK et al., 2008; WOOD, 2010; KAMILERI et al., 2012; MARTEIJN et al., 2014; MENCK & MUNFORD, 2014).

Já existe uma importância clínica verificada quanto ao direcionamento das terapias quimioterápicas para os tipos celulares. MCGURK et al., 2006 verificaram

que em linhagens celulares de câncer de testículo há expressão reduzida de algumas proteínas do NER, como ERCC1, XPF e XPA, quando comparada a outras linhagens celulares mais resistentes à cisplatina por exemplo, que é o quimioterápico de escolha para o tratamento deste tipo de câncer (MCGURK et al., 2006). Mais recentemente, QIU et al., 2014 mostraram que a expressão de proteínas do NER, como XPF e XPC, pode ser um potencial fator preditivo para câncer de bexiga. Através da análise de expressão gênica dos tecidos tumorais de pacientes com câncer de bexiga por qPCR (do inglês – *quantitative polymerase chain reaction*), o estudo mostrou que a expressão dos genes que codificam para XPF e XPC estava reduzida/atenuada nos tumores com episódio de recorrência em comparação à tumores não recorrentes. Além de que o hábito de fumar, conhecido por induzir ou agravar o câncer de bexiga, não seria um fator único na recorrência deste tumor, porém atuaria concomitantemente com essa diferença de expressão de XPF e XPC, agravando o seu desfecho (QIU et al., 2014). KANG et al., 2013 estudaram um polimorfismo em XPC (Lys939Gln) e constataram que pode ser correlacionado com o desfecho clínico de câncer epitelial de ovário, sugerindo que possa servir como um biomarcador para um quimioterapia personalizada dos agentes platinados, utilizados no tratamento deste tumor (KANG et al., 2013).

Existem também, em níveis de pesquisa básica, indicativos de que proteínas do NER (XPA, XPB, XPC, XPD e XPG) estejam envolvidas na resposta às drogas inibidoras da topolII (DESPRAS et al., 2007; SPENCER et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; SAFFI et al., 2010; MORAES et al., 2012). Linhagens celulares com mutações em XPD são mais sensíveis à DOX do que linhagens selvagens, enquanto a complementação das linhagens mutantes com o gene XPD leva a uma diminuição nesta sensibilidade, sendo indicativo de que a helicase XPD esteja envolvida no reparo das lesões induzidas pela DOX (SAFFI et al., 2010). Resultados mais recentes do nosso grupo têm demonstrado também um envolvimento da via NER em resposta aos danos gerados pela MXT, análogo da DOX.

Estes estudos, a nível básico ou clínico, mostram que a avaliação destes polimorfismos ou alterações genéticas em genes de reparo de DNA nos pacientes com câncer pode ser útil na identificação das maiores chances individuais de cada paciente em desenvolver resistência aos quimioterápicos de escolha. Considerando os dados já encontrados pelo grupo e por outros pesquisadores, este trabalho busca uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência tumoral à antraciclinas e

inibidores de Topoisomerase II, tendo como hipótese que esta resistência está, em grande parte, relacionada com o aumento nos processos de reparação do DNA, especialmente a uma modulação das proteínas da via NER.

### **1.3 Linhagens Celulares utilizadas no Estudo**

No presente estudo foram utilizadas duas linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda, adquiridas da ATCC (do inglês – *American Type Culture Collection*), com denominação de HL-60 e sua versão resistente à MXT, HL-60/MX2. Em 1989, HARKER et al., 1989 desenvolveram a linhagem resistente HL-60/MX2 a partir de subcultivos da linhagem HL-60 exposta à concentrações crescentes de MXT. O cultivo das células consistia em 3 dias de exposição à MXT, seguidos por um período de 3 a 7 dias de crescimento em meio livre de droga. Após 21 passagens com este mesmo esquema de tratamento e em concentrações crescentes de MXT, os autores observaram uma população emergente de células capazes de se propagar continuamente em uma concentração de MXT de 0,02µg/mL. Estas células foram cultivadas por mais 20 passagens em meio contendo 0,02µg/mL de MXT, e, ao final da última passagem, foram mantidas por 7 dias em meio livre de droga e testadas para sensibilidade à MXT. Essas células foram denominadas de HL-60/MX1. As células HL-60/MX1 continuaram a ser expostas à concentrações crescentes de MXT, até que emergiu uma população capaz de sobreviver em meio contendo 0,1µg/mL de MXT. Após 6 meses de cultivo com essa concentração de MXT as células foram clonadas por diluições seriadas e as colônias individuais foram propagadas e testadas para sensibilidade à MXT. Um desses subclones foi denominado HL-60/MX2, e, segundo os autores, foi subsequentemente cultivado na presença de MXT por mais de 18 meses e apresentava de 30 a 35 vezes mais resistência do que a linhagem inicial, dando origem então à linhagem resistente HL-60/MX2 utilizada neste trabalho (HARKER et al., 1989).

No mesmo trabalho ainda, a fim de identificar os possíveis mecanismos que conferiam resistência à linhagem, os autores testaram as células HL-60/MX2 para sua capacidade de reter MXT, a qual se demonstrou inalterada. Além disso, não encontraram evidências de alteração no metabolismo da droga dentro das células.

Quando analisaram a expressão de proteínas de membrana que funcionam como bombas de efluxo, como a glicoproteína-P, pela técnica de *immunoblotting* demonstraram não haver uma superexpressão, o que sugere que este também não seria o mecanismo responsável por conferir resistência às células (HARKER et al., 1989).

Após alguns anos, o mesmo grupo publicou um trabalho onde foi investigada a contribuição da alteração na atividade e expressão da enzima TopoII (isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ ) na linhagem resistente, já que esta é a enzima alvo da MXT. Foi demonstrado que havia uma diferença de 2 vezes na atividade catalítica da enzima na linhagem resistente em relação à linhagem sensível, o que mesmo os autores acharam difícil de explicar a alta taxa de resistência, de 30 a 35 vezes (HARKER et al., 1995).

Em 2011, MIKUSOVÁ et al., 2011, investigaram e demonstraram, através de *immunoblotting*, que após um tratamento com MXT por 2 horas a linhagem resistente HL060/MX2 apresentava maior quantidade de DNA-PK, Rad50 e Nbs1, proteínas envolvidas na via NHEJ de reparo de DNA, envolvida na remoção de quebras duplas na fita (MIKUSOVÁ et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

Avaliar a influência de mecanismos de resposta a danos no DNA na resistência tumoral à Mitoxantrona em linhagens celulares de leucemia.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

- Avaliar a sensibilidade das linhagens celulares HL-60 e HL-60/MX2 ao tratamento com MXT, utilizando o Etoposídeo (ETO) como referência por possuir como mecanismo de ação exclusivamente a inibição de topoisomerase II ;
- Analisar o perfil de ciclo celular e a fosforilação da histona H2AX nas duas linhagens, após os tratamentos com MXT e ETO;
- Analisar o nível de expressão gênica nas duas linhagens de genes relacionados à via NER e ao transporte de drogas através da membrana.

Os resultados obtidos durante o mestrado foram agrupados e serão apresentados na forma de um manuscrito intitulado “Influence of DNA Damage Response Mechanisms in Leukemia Cells Resistant to the Antineoplastic Mitoxantrone” a ser submetido à revista *Molecular Cancer Research*. Para facilitar a leitura, as figuras estão inseridas ao longo do texto.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico escrito em forma de *research article* para a revista *Molecular Cancer Research*.

#### **Influence of DNA Damage Response in Leukemia Cells Resistant to the Antineoplastic Mitoxantrone**

*Franciele Faccio Busatto<sup>1,2</sup>, Victoria Pereira Viero<sup>1</sup>,  
Jaqueline Cesar Rocha<sup>1,2</sup>, Jenifer Saffi<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

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

\*Corresponding author: Jenifer Saffi

Laboratory of Genetic Toxicology; Rua Sarmiento Leite , 245

Zip Code: 90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3303 8861; fax: +55 51 3303 8810

E-mail address: [jenifers@ufcspa.edu.br](mailto:jenifers@ufcspa.edu.br)

## **Abstract**

Chemotherapy is one of the main cancer treatment strategies; however, tumors can show resistance, which makes the treatment partial or totally inefficient. Among the mechanisms that may be related to the resistant profile, the most studied is increased drug efflux through ABC transporter permeases. On the other hand, altered DNA repair pathways may contribute to cancer resistance, since the lesions are removed before they become toxic to cells, which reduces chemotherapy effectiveness. Among DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair (NER) is one of the most versatile, and there are studies showing its involvement in removal of anthracyclines-induced lesions. Thus, our aim was to evaluate the contribution of DNA damage response mechanisms, focusing on NER, to the resistance to Mitoxantrone (MXT), an anthracycline analog, using the mitoxantrone-resistant leukemia cell line HL-60/MX2 as a model. After treatment with MXT and Etoposide (ETO), a topoisomerase II inhibitor, cell survival was assessed by trypan blue exclusion method; cell cycle profile and H2AX histone phosphorylation ( $\gamma$ H2AX) were evaluated by flow cytometry; and gene expression levels of NER and efflux proteins were determined by RT-qPCR. Results indicate a different response between the resistant HL-60/MX2 and the sensitive HL-60 cells, as observed in the survival assay, cell cycle, and H2AX phosphorylation profile. Furthermore, in the resistant cells, RT-qPCR analysis showed an increase in the expression of NER genes, with ERCC1 expression increased before treatments, and XPA after the treatments. Therefore, our results indicate the contribution of NER machinery in the resistance of leukemia cells to Mitoxantrone.

## **Introduction**

Chemotherapy is one of the main treatments in cancer therapy; however, drug resistance can limit its effectiveness. There are two ways resistance to chemotherapeutics can occur: tumors may be intrinsically drug-resistant, which means they already present this profile before chemotherapy, or cancer cells can develop this characteristic through mutations arising during the treatment or other adaptive responses, in a process called acquired resistance (1,2). After developing resistance to a single drug, cells may present cross-resistance to other drugs which not necessarily have similar structures and mechanisms of action – a phenomenon known as multidrug resistance (MDR). This might explain why treatment regimens that combine multiple agents with different targets are not more effective (3–5).

Some key characteristics in mediating MDR are increased drug efflux, drug inactivation, alterations in drug targets, increased DNA damage repair, and deregulation of apoptosis (1–3,6). Of these, the most widely studied is the increased drug efflux, which is mediated by membrane proteins, such as ABC transporters, that act as efflux pumps, preventing the drug from acting inside the cells. In addition, increased DNA damage repair also stands out as an important subject of study, since most cytotoxic chemotherapeutic drugs target DNA (1,6).

Removal of DNA lesions before they become toxic might reduce the toxicity of anticancer drugs, contributing to the resistance response, meaning that the effectiveness of cancer treatments can be modulated by DNA repair pathways (7). Among all DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair (NER) is the most versatile, and is involved in the removal of lesions that lead to significant structural distortions in DNA chains. These lesions

include pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts, adducts generated from photoactivated psoralens, cisplatin-purines, alkylating agents, adducts formed by polycyclic carcinogens, such as acetylamino-fluorene, and interstrand crosslinks (7–9).

There is evidence that NER proteins are involved in the response to drugs that inhibit Topoisomerase II (TopoII). Our group has shown that cells deficient in NER proteins are more sensitive to Doxorubicin (DOX) than the wild type (10–12). DOX is a TopoII inhibitor that is also able to induce adducts, interstrand DNA crosslinks, and reactive oxygen species (ROS). The same NER involvement has been observed for Mitoxantrone (MXT) (unpublished data), a structural analog of DOX that similarly inhibits TopoII and also generates other lesions (13–15).

Considering these data, our study aimed to evaluate the contribution of DNA damage response, especially NER, to the resistance of a leukemia cell line to MXT (HL-60/MX2), in comparison with a nonresistant cell line (HL-60).

## **Materials and Methods**

### ***Cell culture***

The human promyelocytic leukemia cell line HL-60 and a Mitoxantrone-resistant variant (HL-60/MX2) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD), Lot number: 59868827 and 58798164, respectively. The culture medium used throughout these experiments was RPMI-1640, supplemented with penicillin and streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were routinely grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

### ***Cell survival assay***

Trypan blue exclusion assay was used to assess cell survival. HL-60 and HL-60/MX2 cells were seeded into 12-well plates at a density of  $10^5$  cells per well, in complete medium. Soon after cells were treated with different concentrations of MXT and Etoposide (ETO) (both drugs were purchased from Sigma-Aldrich) for different times (24h, 48h, 72h, 96h). After each treatment, cells were centrifuged, washed with phosphate-buffered saline solution (PBS), and cell survival was determined by counting on a Neubauer chamber. Viable cells were identified based on their ability to exclude trypan blue dye, while non-viable ones keep the dye inside, showing a blue color.

### ***Flow cytometry analysis (FACS)***

After treatments with MXT and ETO, cells were centrifuged, washed with PBS and fixed with absolute ethanol for at least 24 h at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For cell cycle analysis, fixed cells were resuspended in a buffer containing 0.2 mg/mL RNase and 50  $\mu\text{g/mL}$  propidium iodide (PI) in PBS at room temperature for 30 min. Data were analyzed to determine the percentage of cells at each phase of the cell cycle (sub-G1, G1, S, G2 and  $>4\text{N}$ ). For  $\gamma\text{H2AX}$  analysis, ethanol-fixed cells were incubated with Alexa Fluor 488 mouse anti-H2AX (pS139) at a dilution range from 1:50 to 1:100 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were collected with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with Cell Quest software (Becton Dickinson). A total of 10,000 events were measured per sample in both tests.

### ***Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) for gene expression analysis***

To analyze mRNA levels of some genes of interest, both cell lines were treated with MXT and ETO for 2h. After treatment, cells were centrifuged, washed with PBS, and RNA was extracted using RNeasy® Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 30 µl volumes and stored at -80°C. Before RNA amplification, denaturing agarose gel electrophoresis and A260/A280 measurement were used to estimate the integrity and purity of extracted RNA. To eliminate any remaining DNA, samples were treated with RNase-free DNase (Promega). cDNA was generated by RT-PCR using 1.5µg of total RNA and oligo dT. qPCR was performed with Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies), using StepOne Plus instrument (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) as follows: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, 40 cycles at 95°C for 20 seconds and at 60°C for 1 minute. A list of primers used on this study is presented in table 1. Data analysis was based on the  $\Delta\Delta C_t$  method. The  $C_t$  (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold. Therefore,  $C_t$  levels are inversely proportional to the amount of target nucleic acid in the sample, which means that the lower the  $C_t$  level, the greater the amount of target mRNA in the sample.  $\Delta C_t$  was generated after normalization with housekeeping genes (ACTB and GAPDH) and mRNA levels are presented as the logarithmic scale as  $2^{-\Delta C_t}$ .  $\Delta\Delta C_t$  was calculated by the difference of  $\Delta C_t$  of a particular gene in both cell lines and presented as the logarithmic scale of relative fold change in expression  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values, indicating how often the analyzed genes are more or less expressed in HL-60/MX2 compared to HL-60.

### ***Statistical analysis***

Results are presented as mean of 3 independent experiments with error bars showing the standard error (SE). Statistical analyses were performed using t-test and one-way ANOVA followed by Tukey's test, using the Prism GraphPad software version 5.0. Values of  $p \leq 0.05$  were used to determine significance in all statistical analyses.

**Table 1.** Primer sequences used in RT-qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Description</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>ACTB</b>	Encode for $\beta$ -actina.	CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
<b>GAPDH</b>	Encodes the enzyme Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<b>ABCB1</b>	Multidrug resistance protein 1 (MDR1), also known as P-glycoprotein 1.	GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT	TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC
<b>ABCC1</b>	Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1).	CCGTGTACTIONCAACGCTGACAT	ATGCTGTGCGTGACCAAGATCC
<b>TOP2A</b>	Encodes the enzyme Topoisomerase II $\alpha$ , involved in DNA transcription and replication.	GTGGCAAGGATTCTGCTAGTCC	ACCATTCAGGCTCAACACGCTG
<b>ERCC2</b>	Encodes XPD protein, a helicase involved in NER.	TCACCGACCTTGCTGACTTCTC	GTTCTGTCGTCAAAGGGCTCGA
<b>ERCC8</b>	Encodes for CSA protein, involved in lesion recognition at TC-NER.	GCAGTTTCTGGTCTCCACGTT	CAAACATCCTGATGCTCTTCTCAC
<b>ERCC6</b>	Encodes for CSB protein, involved in lesion recognition at TC-NER.	CGTTGCCTGTGTTTATGGAGCAG	CTGACTTCATTCTCCGCAGTAGG
<b>ERCC1</b>	Encodes for an endonuclease involved mainly in NER.	GCTGGCTAAGATGTGTATCCTGG	ATCAGGAGGTCCGCTGGTTTCT
<b>XPC</b>	Encodes for XPC protein, involved in lesion recognition at GG-NER.	TTGTCGTGGAGAAGCGGTCTAC	CTTCTCCAAGCCTCACCCTCT
<b>XPA</b>	Xeroderma pigmentosum, complementation group A	GAAGTCCGACAGGAAAACCGAG	GATGAACAATCGTCTCCCTTTTCC

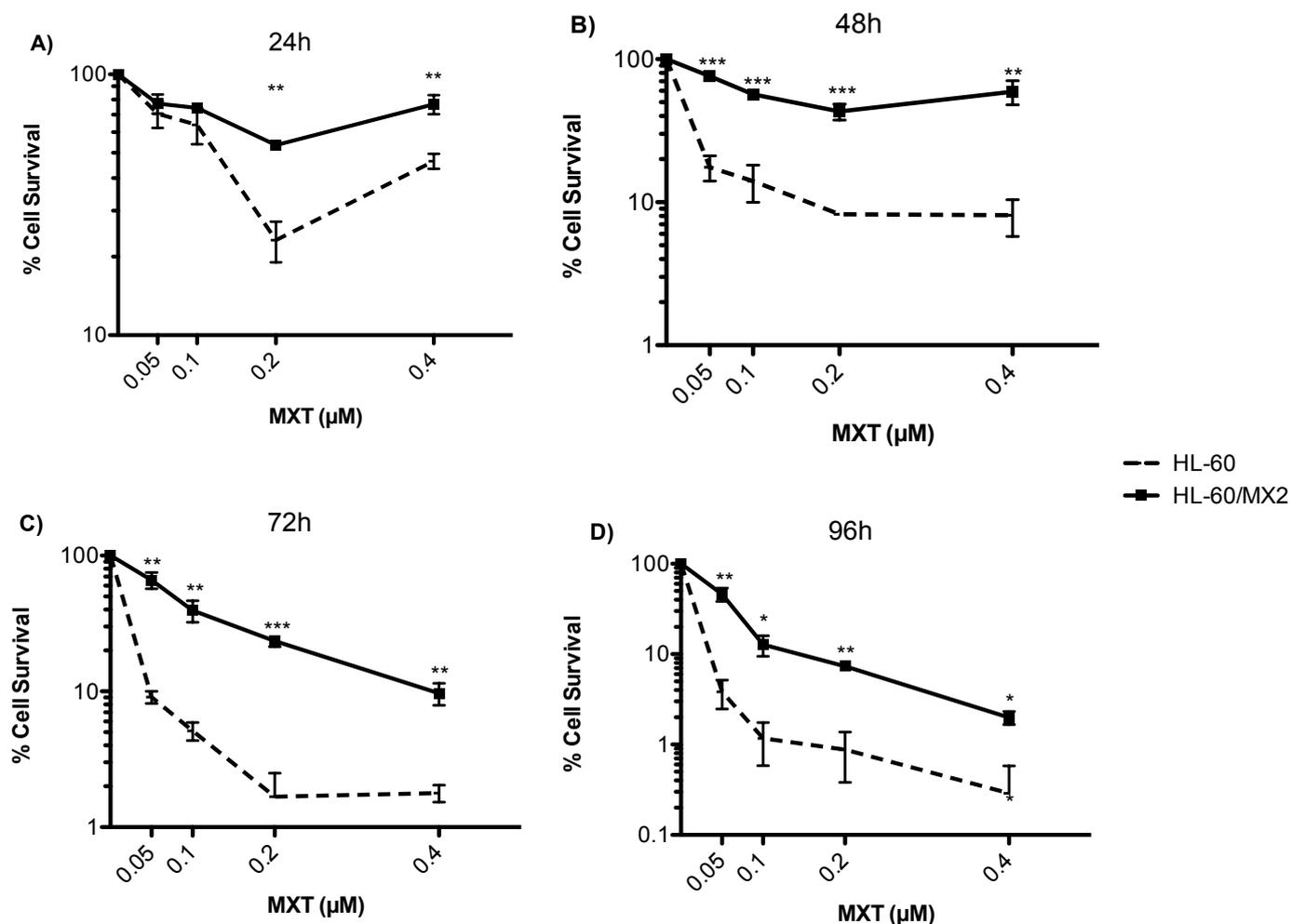
## Results

### *HL-60/MX2 is resistant to TopoII inhibitors*

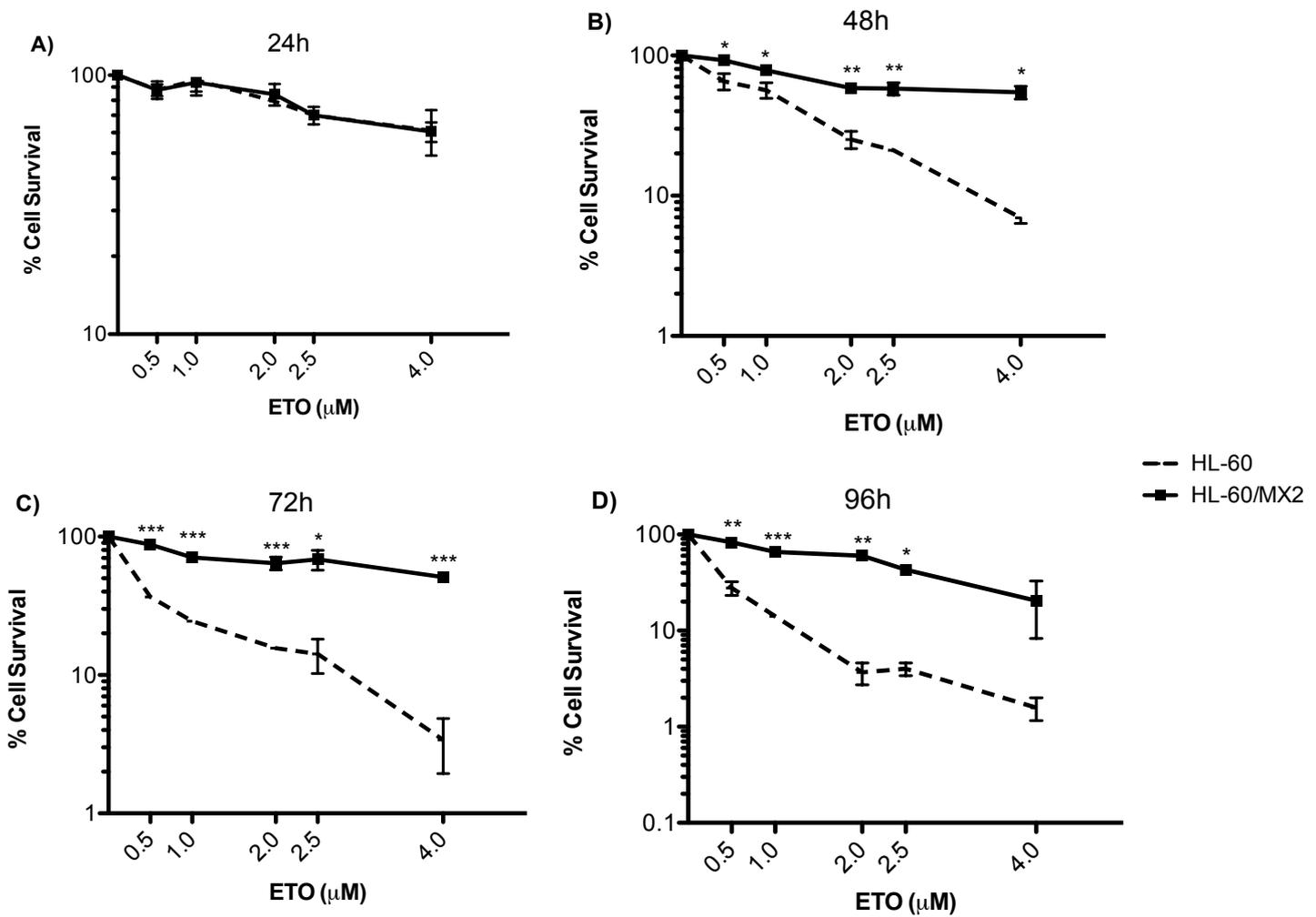
In order to confirm the MXT-resistant profile of HL-60/MX2, we performed a trypan blue exclusion assay to determine the differences in viability between the two cell lines. Fig. 1A shows that HL-60/MX2 is significantly more resistant to MXT than HL-60 in high doses after a treatment of 24h. When exposed to longer treatments of 48h, 72h and 96h, this difference increases and appears also in the low doses (fig. 1B, C, D). After 72h and 96h of treatment, the difference between the cells is reduced when compared to 48h exposure, once HL-60/MX2 has its viability reduced in all doses (Fig. 1C,D). Cells were also treated with ETO, a drug that acts exclusively inhibiting TopoII (16), so we could compare the differences in toxicity between both treatments. It is shown in Fig. 2 that ETO is less cytotoxic than MXT, since after 24h of treatment there is no difference between the two cell lines. Statistically significant differences start to appear after 48h of treatment, in low and high doses. HL-60/MX2 shows resistance not only to MXT but also to ETO; however, this is not surprising, considering that the cross-resistance mechanism is very common in MDR. Moreover, it seems to be more resistant to ETO than to MXT, considering their differences in action mechanisms, since ETO has only the ability to inhibit TopoII, what makes it less cytotoxic.

After that, the resistance factor (RF) of HL-60/MX2 for each treatment was calculated by the following formula:  $IC_{50} \text{ HL-60/MX2} / IC_{50} \text{ HL-60}$ . Results are shown in table 2. In MXT treatment the maximum RF was 35, achieved at 48h, and indicates that HL-60/MX2 is 35-fold more resistant than HL-60. This was the same RF found by Harker

et al, 1989 (17) when HL-60/MX2 was created. In longer treatment times, the resistant cell line has its viability reduced to less than 50%, which contributes for the RF reduction. On the other hand, in ETO treatment, RF was time-dependent, but did not achieve the same level of MXT.



**Figure 1.** Sensitivities of HL-60 and HL-60/MX2 cells to MXT. Cells were exposed to MXT for 24h (A), 48h (B), 72h (C) and 96h (D) and cell survival was assessed by trypan blue exclusion assay right after the treatment. Results are expressed as percentage of control growth for each data point and represent the mean ( $\pm$ standard error) of three independent experiments. Cell survival was compared between the two cell lines by t-test (\*  $p < 0.05$  ; \*\*/\*\*  $p < 0.001$ ).



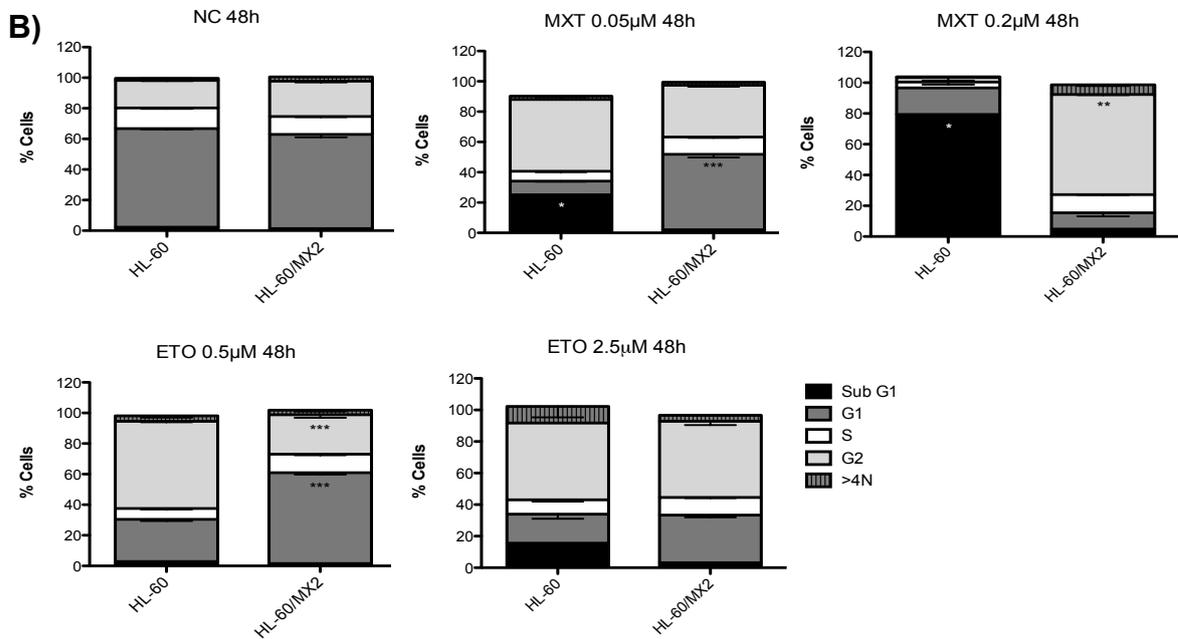
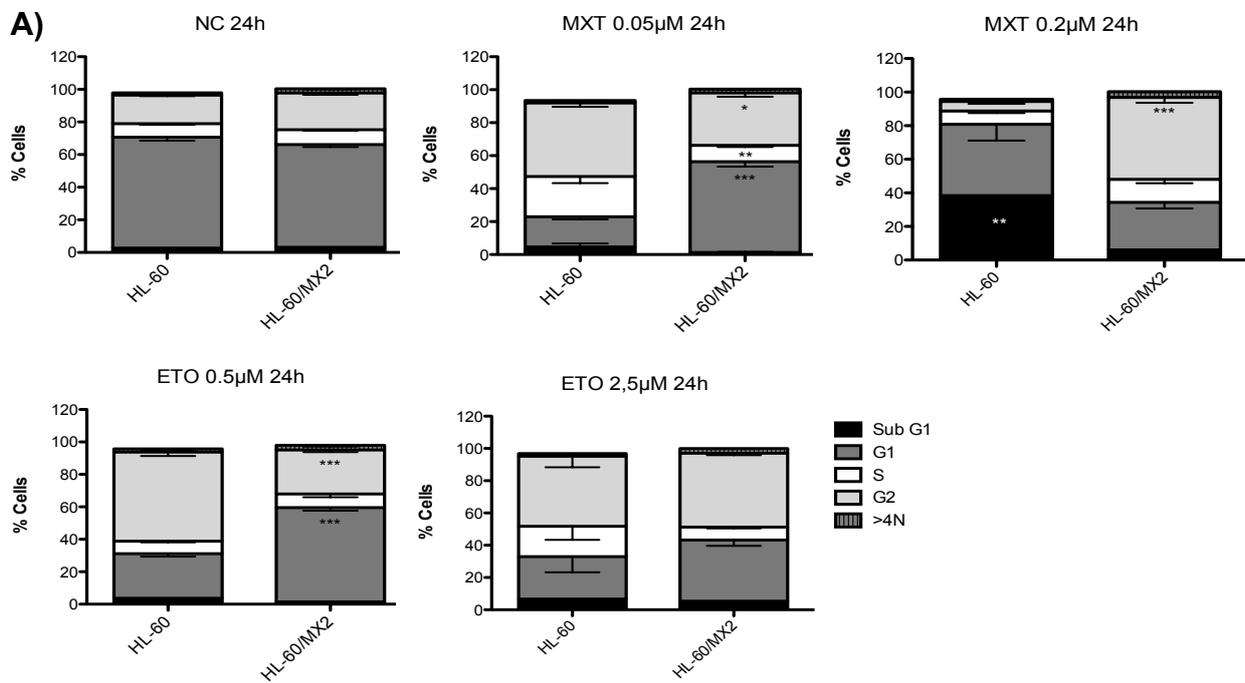
**Figure 2.** Sensitivities of HL-60 and HL-60/MX2 cells to ETO. Cells were exposed to ETO for 24h (A), 48h (B), 72h (C) and 96h (D) and cell survival was assessed by Trypan Blue exclusion assay right after the treatment. Results are expressed as percentage of control growth for each data point and represent the mean ( $\pm$ standard error) of three independent experiments. Cell survival was compared between the two cell lines by t-test (\*  $p < 0.05$  ; \*\*/\*\* p  $< 0.001$ ).

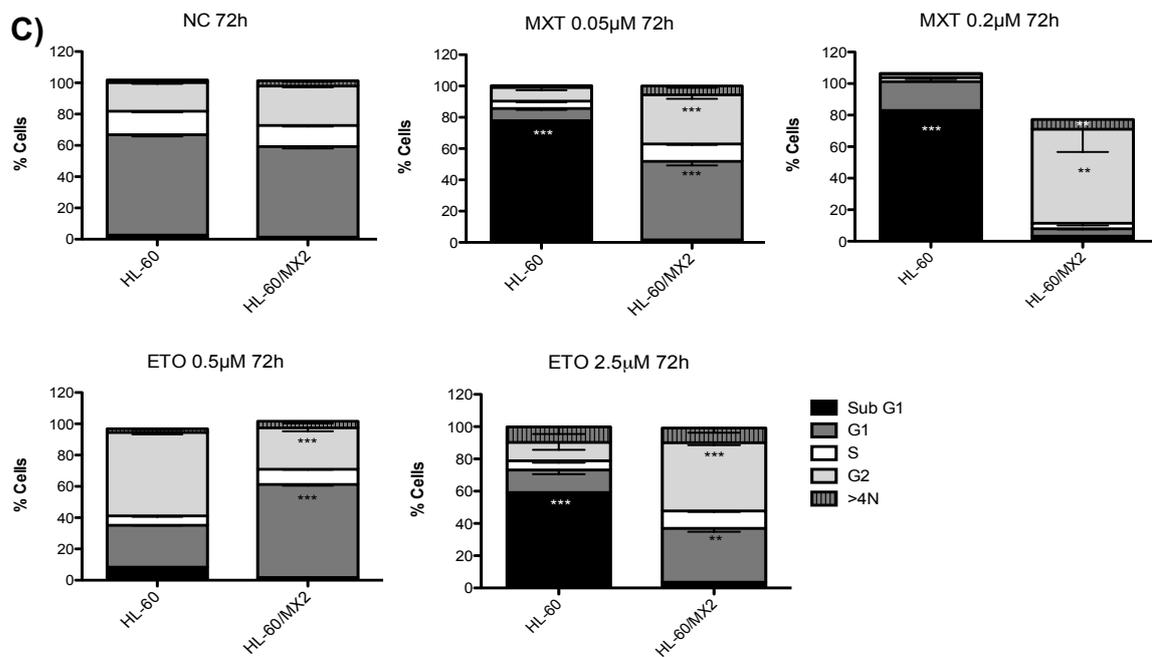
**Table 2.** Resistance factor (RF) of HL-60/MX2 to MXT and ETO in all treatment times. RF was calculated as the ratio of IC50 HL-60/MX2 / IC50 HL-60.

Mitoxantrone (MXT)		Etoposide (ETO)	
Time	RF	Time	RF
24h	3	24h	1
48h	35	48h	2
72h	4	72h	5
96h	1	96h	7

***Cell cycle distribution is different in HL60 and HL60/MX2***

For a better understanding of cellular mechanisms that differ between the two cell lines, their cell cycle profile was analyzed after 24h, 48h and 72h of treatment with MXT and ETO. Fig. 3 shows that, after low doses of MXT (0.05 $\mu$ M) and ETO (0.5 $\mu$ M), HL-60/MX2 shows a normal cell cycle profile, with the majority of cells in G1 phase. HL-60 has an accumulation in G2 phase; however, after 48h these cells start to present a high Sub-G1 population, an indicative of cell death, which is in agreement with the cell survival results (Figs 1 and 2). When treated with high doses of MXT and ETO (up to 0.2  $\mu$ M and 2.5  $\mu$ M, respectively), HL-60/MX2 shows an accumulation in G2 phase in all times, which was not observed for low doses. Moreover, HL-60 cells show an increasing Sub-G1 population from 24h to 72h,, which is also in accordance with the viability assay. Besides the differences between treatment times, the cell cycle profile seems to be time-independent and dose-dependent in HL-60/MX2 cells.





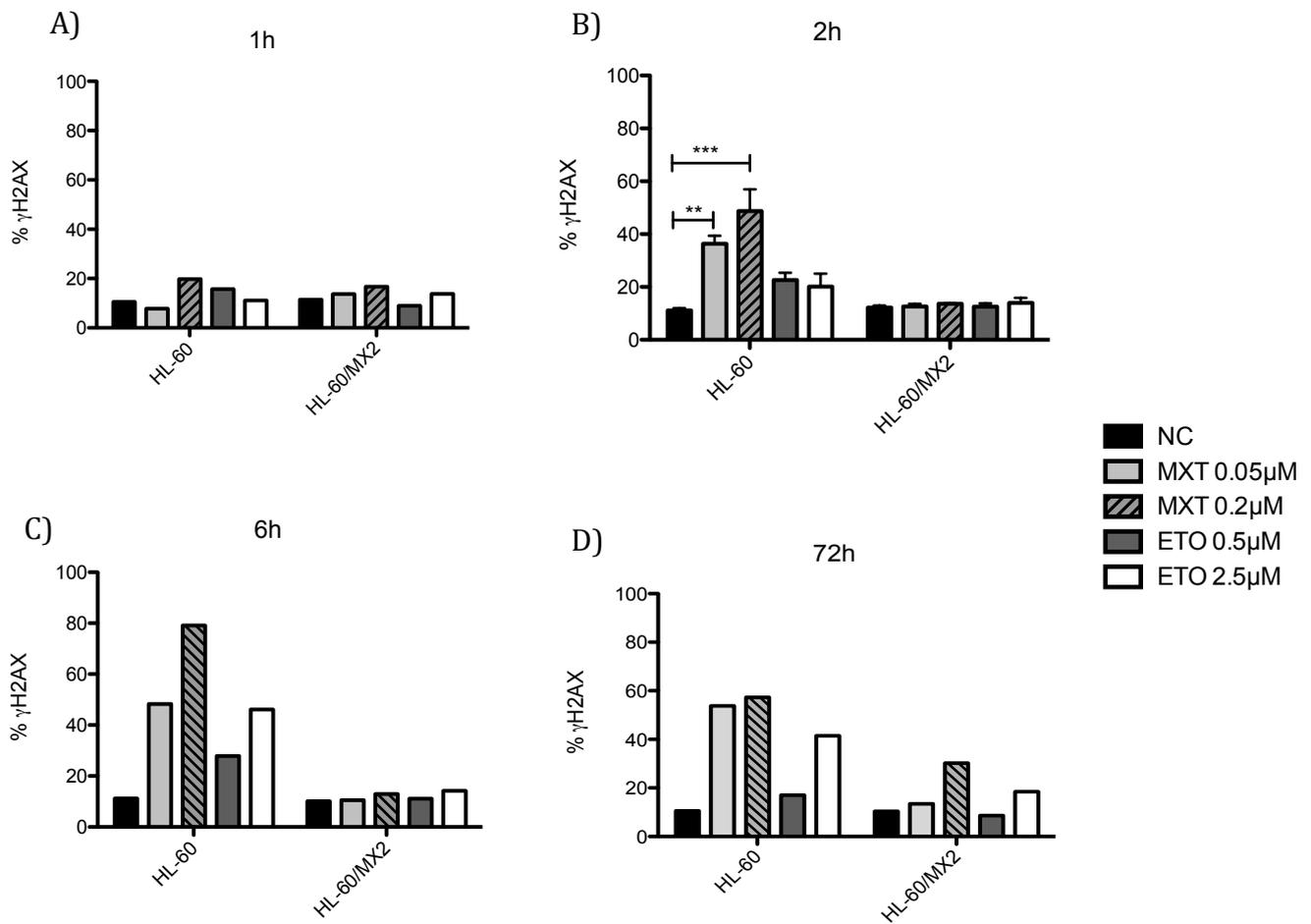
**Figure 3.** Cell cycle analysis after MXT and ETO treatment. HL-60 and HL-60/MX2 were treated with indicated doses of MXT and ETO and analyzed for cell cycle distribution after 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours. Each value represents the mean ( $\pm$ standard error) of three independent experiments. Cell cycle phases were compared between the two cell lines by One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test (\* $p<0.05$ ; \*\*/\*\* $p<0.001$ ).

### *HL-60/MX2 shows late phosphorylation of H2AX*

Although we did not find differences in viability after a 2h treatment (data not shown), we decided to perform a  $\gamma$ H2AX assay in flow cytometer with short and long periods of treatment. With these results, we would be able to verify whether there are

differences in the initial mechanisms of DNA damage response (DDR) between the two cell lines that could explain the resistant profile of HL-60/MX2, and try to understand exactly when this cell line starts to signal for DDR machinery. Fig. 4 shows the H2AX phosphorylation profile in both cell lines with or without the treatments with MXT and ETO.

There are differences in  $\gamma$ H2AX formation between the two cell lines. After 1h of treatment, neither MXT nor ETO induced H2AX phosphorylation in both cell lines. The differences appear after 2h of treatment, when HL-60 presents significantly elevated levels of H2AX phosphorylation when treated with MXT and ETO. HL-60/MX2, in turn, does not change its H2AX phosphorylation, indicating that the resistant cell line does not activate a DDR response at short-time treatments, either at low or high drug concentrations. After 6h of treatment, HL-60/MX2 does not present any  $\gamma$ H2AX formation, while HL-60 shows an increase, indicating that there is still lesion induction in these cells and, according to the trypan blue assay, at this point these cells have not died yet.. When assessed for H2AX phosphorylation after 72h of treatment, HL-60/MX2 seems to have a slight increase after high doses of MXT and ETO in comparison to the control, meanwhile HL-60 shows high levels of  $\gamma$ H2AX in both MXT treatments and at the highest dose of ETO. However, in comparison to the 6h point, there is a decrease in  $\gamma$ H2AX levels in HL-60 after the highest dose of MXT (0.2  $\mu$ M) and the lowest dose of ETO (0.5  $\mu$ M).



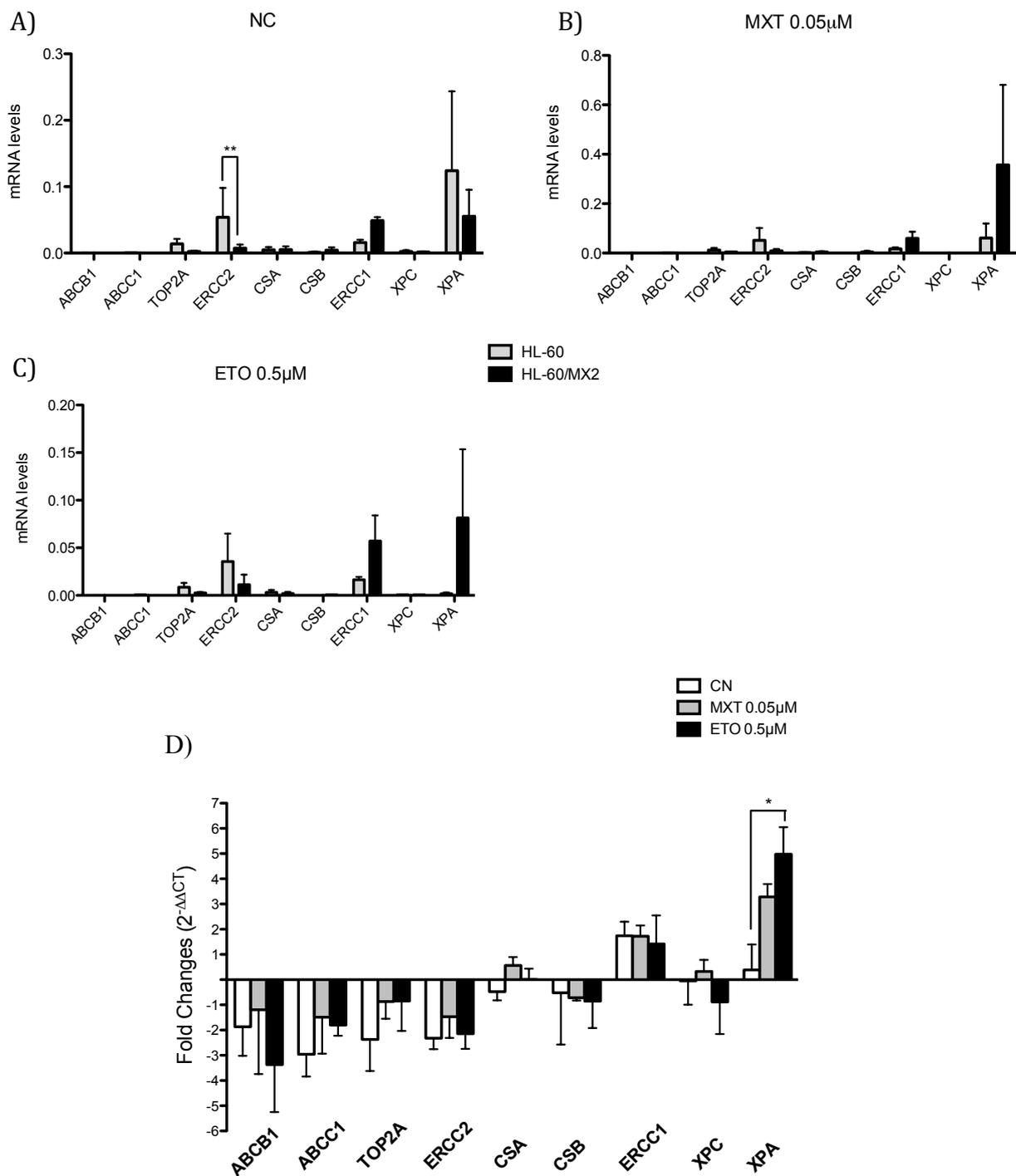
**Figure 4.** H2AX phosphorylation after MXT and ETO treatments. Cells were analyzed for  $\gamma$ H2AX formation by flow cytometer after 1h (A), 2h (B), 6h (C) and 72h (D) of treatment with indicated doses of MXT and ETO. Graphics of 1h, 6h and 72h represent a single analysis; in graphic B, 2h, each value represents the mean ( $\pm$  standard error) of three independent experiments. %  $\gamma$ H2AX formation in the treatments was compared to the Negative Control by One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test (\*\*/\*\*\*p<0.001).

#### ***XPA is involved in HL-60/MX2 resistance to TopoII inhibitors***

To better understand the resistance profile of HL-60/MX2, we analyzed mRNA expression by RT-qPCR for genes of interest that code for ABC transport proteins and

NER proteins. RNA was extracted after 2h of treatment with MXT 0.05 $\mu$ M and ETO 0.5 $\mu$ M.

Analysis of ABC genes ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCC1 (MRP1 protein) in negative control (without treatment) showed that both cell lines have very low mRNA levels for these genes, and there is no difference in their expression between the two cell lines. After MXT and ETO treatments, there were no significant changes in expression. The same was observed for the expression of TOP2A gene and most of NER genes. However, as observed in Fig. 5A-C, ERCC2 was significantly more expressed in HL-60 cells before the treatments, but this difference is reduced after MXT and ETO exposure. Despite not statistically significant, ERCC1 seems to be overexpressed in HL-60/MX2 since negative control, which indicates that this gene is already more expressed in the resistant cells regardless of DNA damage. Furthermore, this difference increases after ETO treatment. Interestingly, XPA levels are higher in HL-60 than in HL-60/MX2 in the absence of drugs, but after treatment occurs the opposite, with high mRNA levels for XPA in HL-60/MX2. In Fig. 5D, the fold change graphic indicates the extent to which a given gene is more expressed in HL-60/MX2 than in HL-60; it shows that XPA is the only analyzed gene with statistically significant differences between expression in HL-60/MX2 in comparison to HL-60, notably after ETO treatment.



**Figure 5.** mRNA analysis of genes of interest after MXT and ETO 2h exposure. RT-qPCR was performed to analyze the expression of indicated genes. A, B and C show mRNA levels for each gene in both cell lines. In D values are shown as the logarithmic scale of relative fold change in expression (RQ)  $2^{-\Delta\Delta CT}$  between HL-60/MX2 and HL-60. Each value represents the mean ( $\pm$ standard error) of three independent experiments. The statistical significance of mRNA levels comparison was determined by t-test between the two cell lines. The observed fold change in expression was determined by One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test (\*p<0.05; \*\*p<0.001).

## Discussion

DNA repair has a clear role in anticancer drug resistance. In response to chemotherapy drugs that either directly or indirectly damage DNA, DDR mechanisms can reverse the drug-induced damages before they become toxic to the cancer cell, reducing the effectiveness of cancer therapy (6,7).

In 1989, Harker et al. (17) developed the resistant cell line HL-60/MX2 and tested this HL-60 variant cells for their ability to retain MXT, which was unaltered. Furthermore, there was no evidence that altered cellular metabolism of MXT was responsible for the reduced sensitivity of MX2 cells to this agent. In the same study, an immunoblotting analysis failed to demonstrate the overexpression of P-glycoprotein in the resistant cells, suggesting that the resistant profile is not likely mediated by altered efflux of the drug (17). After that, in 1995, Harker et al., investigated the contribution of altered activity and expression of TopoII isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  to the resistant profile of HL-60/MX2, and found only a 2-fold difference in cellular TopoII catalytic activity – a fact that even the authors found insufficient to explain the 35-fold difference in MXT sensitivity between HL-60 and HL-60/MX2 (18). For that reason, Mikusová et al. (2011) investigated and demonstrated through an immunoblotting that the resistant cells HL-60/MX2 contain larger amounts of DNA-PK, Rad50 and Nbs1 (proteins involved in the Non-Homologous End Joining, a DNA repair pathway recruited for double strand breaks (DSB's) removal), compared to HL-60 cells, after 2 hours of treatment with MXT (19). This shows the importance of DNA repair proteins in mediating the resistance in tumor cell lines and patient's tumors.

MXT is an anthracenodione, a structural analog of anthracyclines, that acts inhibiting TopoII and generating other lesions such as adducts and crosslinks (13–15). ETO is a podophyllotoxin that acts exclusively inhibiting TopoII, therefore generating only

the ternary cleavable complex DNA-TopoII-drug, which when processed may cause serious problems to the cells (16,20). There are indications that NER proteins are involved in the response to drugs that inhibit TopoII (13–15) and, as our group has been working with MXT in NER-deficient cell lines, we supposed, based on Mikusová et al. (2011) findings, that there might be a NER contribution in the resistance of HL-60/MX2 cells to MXT. Moreover, we wondered whether this NER involvement would be through TopoII inhibition mechanism or related to the other lesions generated by MXT.

Our findings show that, in fact, both cell lines present different profiles of response when treated with MXT and ETO. The first drug seems to be more cytotoxic than the second is, but it was expected, considering that MXT has a broader spectrum of action. The cell cycle profile analysis clearly shows us that HL-60/MX2 also suffers the consequences of the treatments as HL-60, but with certain delay. When the sensitive cells start to change their cell cycle, the resistant ones keep the normal profile; however, when high doses are used, the sensitive cells show an accumulation in Sub-G1 phase, indicating cell death, and then the resistant cells have their cell cycle profile altered, with accumulation in G2. The G2 accumulation can indicate checkpoint mechanism activation, which means that both cell lines can suffer and recognize the drug-induced lesions, but HL-60/MX2 does it slowly. Cell cycle deregulation is known to be closely associated with loss of the regulatory role of p53, an important tumor-suppressor gene that plays a pivotal role in inducing apoptosis in response to cellular damage, including DNA damage. Furthermore, p53 is consistently quoted as being the most frequently mutated gene in human cancers (21). Some DNA damage signaling deficiencies lead to chemotherapy resistance, since cell cycle arrest is not triggered upon DNA damage. Therefore, cells go through the cell cycle unrepaired and fail to undergo proper chromosome segregation during the mitosis phase,

which leads to cell death (22,23). This is an expected mechanism for chemotherapy and probably what happens to HL-60 in our experiments, but resistant cells seem to have their signaling pathway altered, which causes a delay in cell cycle progression.

After a DNA damage occurrence, an important event on cell signaling is phosphorylation of H2AX on serine 139, which results in the formation of H2AX foci, characterizing an early event in DDR response. This leads to structural alterations at the damaged site to promote DNA repair.  $\gamma$ H2AX foci are then rapidly dephosphorylated as signal for the subsequent recruitment of effector proteins. The induction and disappearance of the foci can be, therefore, used to monitor the functioning of the DDR machinery in a cell population exposed to genotoxic stress (24,25). After the experiments for determination of  $\gamma$ H2AX by flow cytometer, it was possible to confirm that HL-60/MX2 presents a late damage induction, which is in agreement with its cell cycle profile. While sensitive HL-60 cells start to present significant differences in  $\gamma$ H2AX induction after 2h of treatment with MXT, resistant HL-60/MX2 cells do not have their profile altered even after 6h of treatment, when HL-60 have their H2AX phosphorylation increased for MXT and ETO treatments. HL-60/MX2 shows an increase in H2AX phosphorylation after 72h of treatment, which is more evident at the highest MXT dose; meanwhile, at the same point, HL-60 seems to decrease its  $\gamma$ H2AX, indicating that DNA repair might be occurring. The difference between the cell cycle and  $\gamma$ H2AX analyses for HL-60/MX2 is that in the latter the phosphorylation induction is not dose-dependent, but probably time-dependent, different from the cell cycle profile.

RT-qPCR analysis showed that the resistance of HL-60/MX2 probably can not be attributed to overexpression of genes that code for efflux-proteins. Beyond that, the resistance profile seems to have some correlation with differences in NER genes, mainly

ERCC1 with and without treatments, and XPA with treatments. ERCC1 works as an endonuclease together with XPF protein, and is responsible for an important step in NER, from where there is no return. Both XPF-ERCC1 cleave the damaged strand at short distances 5' from the lesion (9). XPA encodes for a key NER protein with the same name, involved in the identification of the lesion origin after the recognition by GGR or TCR. XPA is considered a central coordinator of the NER complex because of its diverse functions. Besides stimulating lesion verification by TFIIH complex and binding to altered nucleotides in ssDNA (single strand DNA) after the double strand opening for lesion removal, XPA also interacts with almost all NER proteins (9,11). Another important finding is that there is no significant difference in expression of the TOP2A gene (that encodes for TopoII  $\alpha$ ), which is in agreement with Harker et al. (1995). This ensures that HL-60/MX2 resistance to TopoII inhibitors is not due to overexpression of their target, which could reduce drug effectiveness.

Our data is preliminary, and is important to notice that RT-qPCR provides us an analysis of gene expression, which does not necessarily correlates exactly with protein levels and activity. However, these findings allow us to infer that probably the main mechanism of resistance of HL-60/MX2 to MXT and other TopoII inhibitors is not by transport through efflux proteins, which is the most common mechanism. A recent study, published by YAO et al., 2015, showed an enhance in FANCF expression and monoubiquitination of FANCD2 (two important proteins of the Fanconi Anemia pathway that removes crosslinks in the DNA) in cells resistant to Adryamicin, an anthracycline also known as Doxorubicin, that has a mechanism of action similar to MXT. Additionally, it was observed that these drug-resistant cells had reduced DNA damage compared to drug-sensitive cells, indicating that this DNA repair pathway may confer resistance to this drug

via an enhanced interstrand crosslink repair mechanism, and contributing to show that DNA repair has an important role in chemotherapy resistance mechanisms (26). There is a crosstalk between Fanconi and NER pathways, and it is mainly by the ERCC4 protein, also known as XPF (not analyzed in our study), that, as mentioned before, works as an endonuclease in NER pathway along with ERCC1. Therefore, one of the roles of XPF in FA pathway may be working in concert with other FA endonucleases to coordinate the dual incisions required to release the ICL (27). However, besides ERCC4 known correlation between these two DNA repair pathways, Shen et al. (2009) found that loss of XPC or XPA, two NER important proteins, led to markedly diminished FANCA recruitment compared to complemented wild type cells, suggesting that the canonical FA pathway may function downstream of NER process during recombination-independent crosslink repair (28).

Another study published by Wang et al. (2012) showed reduced expression in DDR proteins, involved in the DNA damage signaling, in oral cancer cells resistant to Cisplatin. Moreover, there was no difference in the DNA repair mechanism of Cisplatin-induced crosslinks, which led them to suppose that an increase in proteins or genes expression involved in repair mechanisms, such as the NER pathway, could allow cells to survive after Cisplatin treatment even with a reduced signaling via DDR (29).

Tumor cells seem to develop other characteristics than their nature ones, which sometimes are much related with the chosen therapy. For example, after an exposure to a drug that generates lesions repaired by a specific pathway, it will be smart for tumor cells to develop alterations in this pathway genes or proteins, trying to overcome these lesions in order to avoid death. As we already know, tumor cells have the great ability to adapt to the microenvironment around them and undergo changes to survive (30).

Furthermore, as we have been studying, this work contributes for the hypothesis that NER is involved in the removal of MXT lesions. Our challenge is to identify what exactly are these lesions and whether or not they are correlated with the TopoII inhibition mechanism of MXT. It is important to identify drug targets that may be not well-defined and analyze their contribution for the development of a resistant profile in chemotherapy. Thus, it will be possible to develop inhibitors for these targets, for example NER proteins for MXT treatment, to improve treatment effectiveness.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge Grasiela Agnes for the support and advices in qPCR analysis. Furthermore, we would like to thank the Brazilian funding agencies CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul).

### **Conflict of Interest Statement**

None.

### **References**

1. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2013;13:714–26.
2. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205:275–92.
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48–58.
4. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, Chen Z-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist Updat*. Elsevier Ltd; 2014;1–17.
5. Szakács G, Paterson JK, Ludwig J a, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:219–34.

6. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6:1769–92.
7. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma R a. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:193–204.
8. Costa R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003;85:1083–99.
9. Marteiijn J a, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2014;15:465–81.
10. Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LFZ, Carvalho H, Henriques J a P, et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9:40–7.
11. Moraes MCS, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JAP, et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett*. 2012;314:108–18.
12. Carvalho H, Garrido LM, Furlan RL a, Padilla G, Agnoletto M, Guecheva T, et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65:989–94.
13. Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A*. 2004;58:99–110.
14. Parker BS, Cullinane C, Phillips DR. Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:2918–23.
15. Skladanowski A, Konopa J. Mitoxantrone and ametantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. *Br J Cancer*. 2000;82:1300–4.
16. Baldwin E, Osheroff N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Curr Med Chem Agents*. Bentham Science Publishers; 2005;5:363–72.
17. Harker WG, Slade DL, Dalton WS, Meltzer PS, Trent JM. Multidrug Resistance in Mitoxantrone-selected HL-60 Leukemia Cells in the Absence of P-Glycoprotein Overexpression Multidrug Resistance in Mitoxantrone-selected HL-60 Leukemia Cells in the Absence of P-Glycoprotein Overexpression1. 1989;4542–9.
18. Harker WG, Slade DL, Parr RL, Feldhoff PW, Sullivan DM, Holguin MH. Alterations in the Topoisomerase II  $\alpha$  Gene , Messenger RNA , and Subcellular Protein Distribution as well as Reduced Expression of the DNA Topoisomerase II  $\beta$

- Enzyme in a Mitoxantrone-resistant HL-60 Human Leukemia Cell Line Alterations in the Topoisomeras. 1995;
19. Mikusová VA, Tichý M, Řezáčová JV. Original Article Mitoxantrone in Combination with a DNA-PK Inhibitor: Possible Therapy of Promyelocytic Leukaemia Resistant Forms. 2011;205:200–5.
  20. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol.* 2013;8:82–95.
  21. Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008;34:378–90.
  22. Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2013;85:1219–26.
  23. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* Nature Publishing Group; 2012;12:801–17.
  24. Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* 2015;1–10.
  25. Scarpato R, Castagna S, Aliotta R, Azzarà A, Ghetti F, Filomeni E, et al. Kinetics of nuclear phosphorylation ( $\gamma$ -H2AX) in human lymphocytes treated in vitro with UVB, bleomycin and mitomycin C. *Mutagenesis.* 2013;28:465–73.
  26. Yao C, Du W, Chen H, Xiao S, Huang L, Chen F-P. Involvement of Fanconi anemia genes FANCD2 and FANCF in the molecular basis of drug resistance in leukemia. *Mol Med Rep.* Spandidos Publications; 2015;11:4605–10.
  27. Mouw KW, D'Andrea AD. Crosstalk between the nucleotide excision repair and Fanconi anemia/BRCA pathways. *DNA Repair (Amst).* Elsevier B.V.; 2014;19:130–4.
  28. Shen X, Do H, Li Y, Chung W-H, Tomasz M, de Winter JP, et al. Recruitment of fanconi anemia and breast cancer proteins to DNA damage sites is differentially governed by replication. *Mol Cell.* 2009;35:716–23.
  29. Wang L, Mosel AJ, Oakley GG, Peng A. Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:2401–9.
  30. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* Elsevier Inc.; 2011;144:646–74.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho objetivou-se avaliar a contribuição da via NER na resistência tumoral de uma linhagem de leucemia à MXT. Sabendo-se o mecanismo de ação desta droga, utilizou-se também o ETO nos tratamentos, a fim de verificar se a influência do NER seria através do mecanismo de inibição de topoll, um dos mecanismos de ação da MXT e único do ETO, ou se seriam as outras lesões geradas pela MXT responsáveis pelo recrutamento da via NER. Foi observado que, em resposta aos tratamentos com MXT e ETO, a linhagem HL-60/MX2 demonstrou-se mais resistente do que a linhagem HL-60, no entanto esse perfil foi mais característico em baixas doses dos quimioterápicos, uma vez que quando exposta a doses maiores a HL-60/MX2 também apresentava sensibilidade à MXT e ao ETO. Este, contudo, demonstrou-se sempre menos citotóxico em relação à MXT. Isto é explicado pelo seu mecanismo de ação mais restrito, mas podemos inferir que apesar de não serem as únicas responsáveis pela resistência observada, as outras lesões geradas pela MXT também contribuem para este perfil.

A fim de aproximar os experimentos da prática clínica, também foi realizado um teste de sobrevivência com um tempo mais longo de tratamento e período de recuperação. As células foram tratadas com MXT (0,05 $\mu$ M e 0,2 $\mu$ M) e ETO (0,5 $\mu$ M e 2,5 $\mu$ M) por 5 dias. Após esse tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan através da contagem das células viáveis na câmara de Neubauer. Neste mesmo momento era trocado o meio de cultura destas células por um meio livre de droga, e assim manteve-se o cultivo das mesmas por um período de recuperação de 21 dias. A cada 7 dias a viabilidade era novamente determinada pelo mesmo método de contagem e o meio das células substituído por meio novo. A figura 9 demonstra os resultados deste experimento, onde é possível notar que na dose mais baixa de MXT (0,05 $\mu$ M) a linhagem resistente, HL-60/MX2, permanece com uma sobrevivência próxima de 100% mesmo após o tratamento. Já com a dose mais alta (0,2 $\mu$ M) a linhagem não apresenta capacidade de recuperação após o período do tratamento. Estes dados vão de acordo com os apresentados no artigo, indicando

que realmente a resistência desta linhagem se aplica somente a doses mais baixas de MXT. Com relação ao tratamento com ETO, a dose mais baixa (0,5 $\mu$ M) não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de nenhuma das linhagens celulares, no entanto, na dose de 2,5 $\mu$ M, observa-se uma redução na sobrevivência da linhagem sensível HL-60 para aproximadamente 50% já nos primeiros 5 dias de tratamento, e essa sobrevivência não é recuperada no período pós tratamento. Já na linhagem HL-60/MX2 isto não acontece, uma vez que sua viabilidade permanece alta durante o período do tratamento e recuperação, mostrando que esta também apresenta resistência ao ETO, porém, devido à sua reduzida citotoxicidade, em doses mais altas.

É importante ressaltar que, na nossa opinião, esta linhagem comercial HL-60/MX2 não se caracterizou como um bom modelo para estudo de resistência tumoral, uma vez que sua resistência só é verificada quando exposta à baixas doses ou altas doses porém de quimioterápicos menos citotóxicos, como é o ETO.

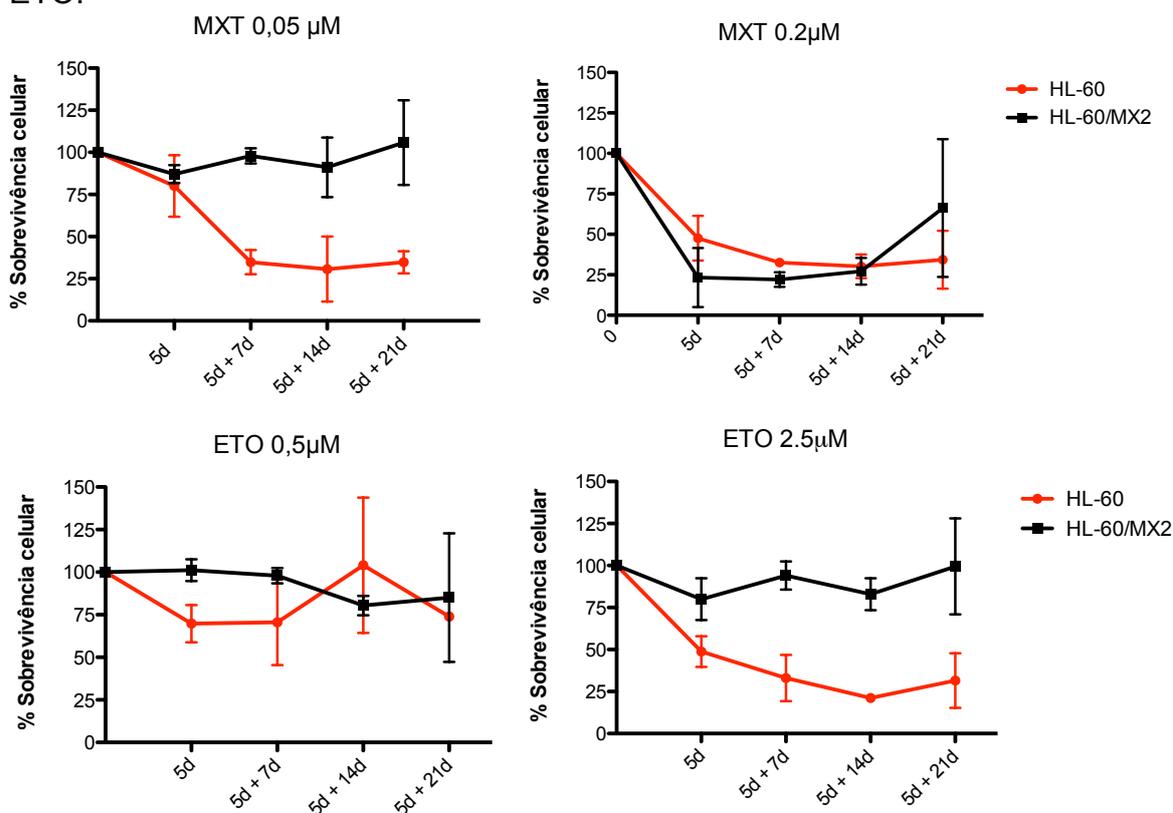


Figura 9: Sobrevivências após tratamento de 5 dias com MXT e ETO e 21 dias em recuperação. Os resultados foram obtidos pelo método de exclusão por azul de tripan.

No resultado da análise do perfil de ciclo celular novamente se confirma a hipótese de que a resistência da linhagem HL-60/MX2 é apenas nas doses mais baixas de MXT, uma vez que após os diferentes tempos de tratamento (24h, 48h e 72h) só houve alteração no perfil de ciclo destas células quando tratadas com a dose maior de MXT (02 $\mu$ M). Já a linhagem HL-60 demonstra um acúmulo de células em G2 nas doses mais baixas de tratamento, o que pode ser interpretado como parada para ativação de um mecanismo de checkpoint por reconhecimento de alguma lesão no DNA. Nos tempos mais longos e doses mais altas (tanto de MXT como ETO), a linhagem sensível passa a apresentar um aumento em Sub-G1, indicativo de morte celular. Isto vai de acordo com os resultados de sobrevivência, e pode-se inferir que estas células reconhecem a lesão previamente e quando não conseguem repará-la iniciam um processo de morte, que por consequência também acontece antes em relação às células resistentes. Seria interessante analisar aqui, qual o mecanismo de morte que ocorre nas duas linhagens e se é ou não o mesmo entre elas.

Quando analisadas para sinalização de dano via DDR através da marcação com  $\gamma$ H2AX, as células resistentes demonstraram um perfil diferente das sensíveis. Mesmo em tempos curtos, onde não foi observada morte celular em nenhuma das linhagens, a HL-60 apresenta uma sinalização significativa após o tratamento com MXT por 2h, enquanto que a HL-60/MX2 tem a sua sinalização via fosforilação de H2AX apenas em tempos maiores de tratamento (72h) e na dose mais alta de MXT (0,2 $\mu$ M). Neste caso foram testados os tempos de 1h, 2h, 6h e 72h, mas pretendemos acompanhar nos tempos de 24h e 48h também, para podermos analisar qual o momento exato onde a linhagem resistente passa a sinalizar a presença do dano via DDR. WANG et al., 2012 encontraram uma expressão reduzida de proteínas da via DDR em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de cavidade oral/laríngea resistentes à Cisplatina em comparação com uma linhagem sensível. Além disso, ao contrário do esperado, não verificaram uma alteração nos mecanismos de reparo dos *crosslinks* induzidos pela Cisplatina através da análise por Ensaio Cometa entre as duas linhagens. Uma das hipóteses levantadas pelos autores é que pode haver um aumento na expressão de genes e proteínas envolvidos na via NER ou

outros mecanismos, que permitiram que as células sobrevivessem após o tratamento com Cisplatina, mesmo com a sinalização do dano reduzida (WANG et al., 2012).

Com os tratamentos em doses baixas e em um tempo curto de 2h, foi realizada a análise da expressão gênica de genes da via NER e proteínas transportadoras ABC. Não foi observada uma expressão alta dos mRNAs correspondentes às proteínas ABC em nenhuma das linhagens, indicando que este não é o principal mecanismo envolvido na resistência da HL-60/MX2. A expressão do gene ERCC2, codificante para a proteína XPD da via NER, foi significativamente maior na linhagem sensível previamente aos tratamentos, porém essa diferença encontra-se atenuada após a exposição aos quimioterápicos. Já a expressão de ERCC1, embora sem diferença estatisticamente significativa, encontra-se sempre maior na linhagem resistente do que na sensível. Curiosamente, no controle negativo os níveis de mRNA de XPA são maiores na linhagem HL-60, no entanto, após os tratamentos com MXT e ETO essa expressão se inverte, mostrando-se cerca de aproximadamente 10 e 60 vezes superior na HL-60/MX2 respectivamente, conforme pode ser observado no gráfico de Fold Change apresentado no artigo na figura 5D. Este resultado ainda precisa ser melhor investigado e confirmado, no entanto sugere uma maior participação dos mecanismos de remoção de danos no DNA, como algumas proteínas da via NER, do que dos mecanismos de efluxo de drogas, na resistência da linhagem HL-60/MX2.

Mais estudos se fazem necessários para uma melhor identificação da importância das vias de reparo de DNA no desenvolvimento da resistência tumoral, podendo assim surgir novos alvos terapêuticos relacionados à esses mecanismos e que melhorariam a eficácia do tratamento.

## 5. PERSPECTIVAS

- Determinar a expressão proteica por *Western blotting* de proteínas de efluxo, sinalização celular e da via NER;
- Investigar o mecanismo de morte celular após os tratamentos;
- Analisar o tempo de duplicação das células pelo método de *Population doubling time*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY [homepage na internet]. Disponível em: <http://www.cancer.org>. Acesso em 6 de janeiro de 2015.

ANREDDY N, GUPTA P, KATHAWALA RJ, PATEL A, WURPEL JN, CHEN ZS. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. *Molecules*, 19: 13848–13877, 2014.

ASSARAF YG & BORGNIA MJ. Differential reversal of lipophilic antifolate resistance in mammalian cells with modulators of the multidrug resistance phenotype. *Anticancer Drugs*, 4: 395–406, 1993.

ASSARAF YG, DRORI S, BACHRACH U, SHAUGAN-LABAY V. Determination of multidrug resistance levels in cultured mammalian cells using ornithine decarboxylase activity. *Anal. Biochem*, 216: 97–109, 1994.

ASSARAF YG, et al. Loss of multidrug resistance protein 1 expression and folate efflux activity results in a highly concentrative folate transport in human leukemia cells. *J. Biol. Chem*, 278: 6680–6686, 2003.

ASSARAF YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 153–181, 2007.

AU WW, et al. Comparative Structure-Genotoxicity Study of Three Aminoanthraquinone Drugs and Doxorubicin. *Cancer Research*, 41: 376-379, 1981.

AZAROVA AM, et al. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 104: 11014–19, 2007.

BAKOS E, et al. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem*, 273: 32167–32175, 1998.

BALDWIN E & OSHEROFF N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Curr Med Chem Agents. Bentham Science Publishers*, 5: 363–72, 2005.

BINASCHI M, et al. Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 1: 113–30, 2001.

BLASIAK J, GLOC E, WARSZAWSKI M. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol*, 49(1): 145-55, 2002.

BOGLIOLO M, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*, 2;92(5):800-6, 2013.

BORCHMANN P, HÜBEL K, SCHNELL R, ENGERT A. Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 35: 80–3, 1997.

BORDIN L, et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat. Res*, 753(2): 91-9, 2013.

BORTHS EL, LOCHER KP, LEE AT, REES DC. The structure of Escherichia coli BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 99: 16642–16647, 2002.

BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acesso em: 6 de janeiro de 2015.

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

CARVALHO H, et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65(5): 989-94, 2010.

CERBINSKAITE A, MUKHOPADHYAY A, PLUMMER ER, CURTIN NJ, EDMONDSON RJ. Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer Treat Rev*, 38(2): 89–100, 2012.

CHEMOCARE [homepage na Internet]. The Scott Hamilton CARES Initiative. Disponível em: <http://www.chemocare.com>. Acesso em 6 de janeiro de 2015.

CHRISTMANN M, TOMICIC MT, ROOS WP, KAINA B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2): 3-34, 2003.

CHU MM, MA Y, TSE KY, CHAN KK, NGAN HY. Cyclophosphamide, hydroxyurea, actinomycin d, methotrexate, and vincristine in the treatment of gestational trophoblastic neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 25(3):498-503, 2015.

CHUGUN A. et al. Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated Guinea-pig heart preparations. *J. Vet. Med. Sci*, 70: 255-264, 2008.

COLE SP, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258: 1650–1654, 1992.

COLE SP, et al. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, 54: 5902–5910, 1994.

DANAEI G, HOORN SF, LOPEZ AD, MURRAY CJL, EZZATI M, AND THE COMPARATIVE RISK ASSESSMENT COLLABORATING GROUP. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366: 1784-93, 2005.

DE GORTER MK, XIA CQ, YANG JJ, KIM RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52:249-73, 2012.

DEAN M & ANNILO T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, 6: 123–142, 2005.

DEANS AJ & WEST SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(7): 467–480, 2013.

DESPRAS E, et al. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res*, 67(6): 2526-2534, 2007.

DEVITA VT Jr & CHU E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21):8643-53, 2008.

DIJK M, TYPAS D, MULLENDERS L, PINES A. Insight in the multilevel regulation of NER. *Exp Cell Res*, 329(1):116-23, 2014.

DOYLE LA, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci*, 95: 15665–15670, 1998.

DURR FE. Biologic and biochemical effects of mitoxantrone. *Semin Oncol*, 11: 3-10, 1984.

ERMOLAEVA MA, et al. Quality control mechanisms in cellular and systemic DNA damage responses. *Ageing Res. Rev*, in press, 2015.

FAULDS D. et al. Mitoxantrone: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs*, 41: 400-449, 1981.

FORTUNE JM & OSHEROFF N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 64: 221–53, 2000.

GALM U, HAGER MH, VAN LANEN SG, JU J, THORSON JS, SHEN B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediyne, and mitomycin. *Chem Rev*, 105(2):739-58, 2005.

GLAVINAS H, KRAJCSI P, CSEREPES J, SARKADI B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv*, 1: 27–42, 2004.

GOLDSTEIN LJ, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst*, 81: 116–124, 1989.

GOTTESMAN MM & AMBUDKAR SV. Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr*, 33: 453–458, 2001.

GOTTESMAN MM, FOJO T, BATES SE. Multidrug Resistance In Cancer: Role Of Atp-Dependent Transporters. *Nature*, 2: 48-58, 2002.

HANAHAH D & WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74, 2011.

HELLEDAY T, PETERMANN E, LUNDIN C, HODGSON B, SHARMA R. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(3): 193–204, 2008.

HOEJIMAKERS JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374, 2001.

HOLLAND IB. ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. *Essays Biochem*, 50: 1–17, 2011.

HOLOHAN C, VAN SCHAEYBROECK S, LONGLEY DB, JOHNSTON PG. Cancer drug resistance: an evolvingparadigma. *Nat Rev Cancer*, 10: 714-26, 2013.

HOOIJBERG JH, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res*, 59: 2532–2535, 1999.

HOWARD TM. et al. Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. *Proc Nati Acad Sci USA*, 91: 12031-12035, 1994.

HSIANG YH, HERTZBERG R, HECHT S, LIU LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 260(27): 14873–8, 1985.

HUANG X. et al. Activation of ATM and histone H2AX phosphorylation induced by mitoxantrone but not by topotecan is prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Biology and Therapy*, 5(8): 959-964, 2006.

IFERGAN I, SHAFRAN A, JANSEN G, HOOIJBERG JH, SCHEFFER GL, ASSARAF YG. Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression. A role for BCRP in cellular folate homeostasis. *J. Biol. Chem*, 279: 25527–25534, 2004.

IYAMA T & WILSON DM 3d. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 12(8):620-36, 2013.

JORDAN MA & WILSON L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4: 253-265, 2004.

JULIANO RL & LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 152–162, 1976.

KAMILERI I, KARAKASILIOTI I, GARINIS GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet*, 28(11):566–73, 2012.

KANG S, SUN HY, ZHOU RM, WANG N, HU P, LI Y. DNA repair gene associated with clinical outcome of epithelial ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(2):941-6, 2013.

KATHAWALA RJ, GUPTA P, ASHBY JR CR, CHEN ZS. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist. Updat*, in press, 2014.

KAUFMANN SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 195-211, 1998.

KIM H & D'ANDREA AD. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev*, 26(13): 1393–408, 2012.

KRUH GD & BELINSKY MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537–7552, 2003.

LUO J, SOLIMINI NL, ELLEDGE SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5):823-37, 2009.

LESCHZINER G, et al. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenet. Genomics*, 16: 439–450, 2006.

LESLIEA EM, DEELEYB RG, COLEB SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3): 216–237, 2005.

LI J, et al. Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6–4) photoproduct by photolyase. *Nature*, 466: 887–890, 2010.

LIU C, et al. A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res*, 42(10): 6106-27, 2014.

LIU FL. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*, 58: 351- 375, 1989.

LOCHER KP & BORTHS E. ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett*, 564: 264–268, 2004.

LOCHER KP. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 14: 426–431, 2004.

LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5): 330-8, 2003.

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

MADDURI K, et al. Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat Biotechnol*, 16(1): 69-74, 1998.

MARTEIJN JA, LANS H, VERMEULEN W, HOEIJMAKERS JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7):465-81, 2014.

MAYNARD S, SCHURMAN SH, HARBOE C, DE SOUZA-PINTO NC, BOHR VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30(1): 2-10, 2009.

MCCLENDON AK & OSHEROFF N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res*, 623: 83–97, 2007.

MCGURK CJ, et al. Regulation of DNA repair gene expression in human cancer cell lines. *J Cell Biochem*, 97(5): 1121-36, 2006.

MENCK CF & MUNFORD V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol*, 37:220-33, 2014.

MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56: 185–229, 2004.

MIYAKE K, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*, 59: 8–13, 1999.

MORAES MC, et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett*, 314(1): 108-18, 2012.

MORROW CS, PEKLAK-SCOTT C, BISHWOKARMA B, KUTE TE, SMITHERMAN PK, TOWNSEND AJ. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Mol. Pharmacol*, 69: 1499–1505, 2006.

NAJAR IA, JOHRI RK. Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide. *J Biosci*, 39(1):139-44, 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Chemotherapy and You: Support for people with cancer. NIH publication n° 11-7156, 2011.

NEIDLE S & THURSTON DE. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 5(4):285-96, 2005.

NICK MCELHINNY SA, KISSLING GE, KUNKEL TA. Differential correction of lagging-strand replication errors made by DNA polymerases {alpha} and {delta}. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:21070–21075, 2010.

NITISS JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5): 338–50, 2009.

PARKER BS, CULLINAME C, PHILLIPS DR. Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. *Nucleic Acids Research*, 27: 2918-2923, 1999.

POLYAK K, HAVIV I, CAMPBELL IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*, 25(1):30-8, 2009.

POMMIER Y, LEO E, ZHANG H, MARCHAND C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol. Elsevier Ltd*, 17(5): 421–33, 2010.

POMMIER Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev*, 109: 2894–902, 2009.

POMMIER Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*, 8: 82–95, 2013.

QIU J, et al. Attenuated NER expressions of XPF and XPC associated with smoking are involved in the recurrence of bladder cancer. *PLoS One*, 9(12):e115224, 2014.

ROSSATO LG, et al. Mitochondrial cumulative damage induced by mitoxantrone: late onset cardiac energetic impairment. *Cardiovasc Toxicol*, 14(1):30-40, 2014a.

ROSSATO LG, et al. Cumulative Mitoxantrone-Induced Haematological and Hepatic Adverse Effects in a Subchronic In vivo Study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114(3):254-62, 2014b.

ROSSATO LG, et al. The metabolic profile of mitoxantrone and its relation with mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol*, 87(10):1809-20, 2013.

RUMJANEK VM, VIDAL RS, MAIA RC. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines? *Biosci. Rep*, 33(6): 875–88, 2013.

SAFFI J, et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XP-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair*, 9: 40–47, 2010.

SAFFI J & HENRIQUES JAP. Reparação de DNA em Células Eucarióticas. In: Da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. (Eds.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: *Alcance*, 2003.

SALE JE, LEHMANN AR, WOODGATE R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(3): 141–52, 2012.

SARASIN A & STARY A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA Repair (Amst)*, 6(2): 265–9, 2007.

SARKADI B, HOMOLYA L, SZAKACS G, VARADI A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol. Rev*, 86: 1179–1236, 2006.

SAUNA ZE & AMBUDKAR SV. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl Acad. Sci*, 97: 2515–2520, 2000.

SCHINKEL AH & JONKER JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 55: 3–29, 2003.

SCHMIDT M & BASTIANS H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resistance Updates*, 10:162–181, 2007.

SENIOR AE & BHAGAT S. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry*, 37: 831–836, 1998.

SHI Z, LIANG YJ, CHEN ZS, WANG XH, DING Y, CHEN LM, FU LW. Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein. *Oncol. Rep*, 17: 969–976, 2007.

SHIRAVASTAV M, DE HARO LP, NICKOLOFF JA. Regulation of double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18: 134–147, 2008.

SHUCK SC, SHORT E, TURCHI JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*, 18(1):64–72, 2008.

SHUKLA S, WU CP, AMBUDKAR SV. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 4: 205–223, 2008.

SIEGEL R, MA J, ZOU Z, JEMAL A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64(1):9-29, 2014.

SILVA R, et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy, *Pharmacology & Therapeutics*, in press, 2015.

SKLADANOWSKI A & KONOPA J. Mitoxantrone and amemantone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. *British Journal of Cancer*, 82: 1300-1304, 2000.

SMITH LA. et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*, 210(337): 1471-2407, 2010.

SODANI K, PATEL A, KATHAWALA RJ, CHEN ZS. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin. J. Cancer*, 31: 58-72, 2012.

SPENCER DMS, et al. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 638: 110-121, 2008.

SU X & HUANG J. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. *Protein Cell*, 2(9): 704-711, 2011.

SYKORA P, WILSON DM, BOHR VA. Base excision repair in the mammalian brain: implication for age related neurodegeneration. *Mech Ageing Dev*, 134(10): 440-8, 2013.

TIWARI AK, SODANI K, DAI CL, ASHBY JR CR, CHEN ZS. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 12: 570-594, 2011.

UEDA K, CORNWELL MM, GOTTESMAN MM, PASTAN I, RONINSON IB, LING V, RIORDAN JR. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for Pglycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 141: 956-962, 1986.

UGHACHUKWU PO & UNEKWE PC. Efflux Pump-Mediated Resistance in Chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res*, 2:191-8, 2012.

WANG L, MOSEL AJ, OAKLEY GG, PENG A. Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer. *Mol Cancer Ther*, 11(11):2401-9, 2012.

WANG YJ, ZHANG YK, KATHAWALA RJ, CHEN ZS. Repositioning of tyrosine kinase inhibitors as antagonists of ATP-binding cassette transporters in anticancer drug resistance. *Cancers (Basel)*, 6: 1925-1952, 2014.

WHITE RJ & DURR FE. Development of mitoxantrone. *Invest New Drugs*, 2: 85-93, 1985.

WILSTERMANN AM & OSHEROFF N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. *Curr Top Med Chem*, 3: 321–38, 2003.

WOOD RD. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. *Environ Mol Mutagen*, 526: 520–6, 2010.

WU CP, HSIEH CH, WU YS. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Mol. Pharm*, 8: 1996–2011, 2011.

YANG F, KEMP CJ, HENIKOFF S. Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters. *Mutat Res*, 773:9-15, 2015.

ZHANG Y-W, REGAIRAZ M, SEILER J A, AGAMA KK, DOROSHOW JH, POMMIER Y. Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 39(9): 3607–20, 2011.

## **CURRICULUM VITÆ**

### **BUSATTO, F.F.**

#### **1. DADOS PESSOAIS**

- Nome: Franciele Faccio Busatto
- Local e data de nascimento: Caxias do Sul, RS, Brasil – 09/03/1990
- Endereço profissional: Rua Sarmento Leite, 245 – Lab. Genética Toxicológica
- Telefone profissional: (51) 3303-8803
- E-mail: franbusatto@gmail.com

#### **2. FORMAÇÃO**

- Especialização em Farmacologia e Toxicologia (PUCRS, 2013-2014).
- Graduação em Biomedicina (UFCSPA, 2009-2012);
- Ensino profissional de nível técnico em Administração (CETEC-UCS, 2006-2008)

#### **3. ESTÁGIOS**

- Estágio curricular em Pesquisa Clínica Hospital Moinhos de Vento - HMV (junho-novembro/2012)
- Estágio curricular no laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA (janeiro-junho/2012)
- Bolsista de Iniciação Científica CNPq do laboratório de Genética Toxicológica UFCSPA (agosto/2011 a dezembro/2012)
- Bolsista de Iniciação Científica CNPq do laboratório de Biologia Molecular UFCSPA (agosto/2010 a julho/2011)

#### **4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

- Trabalho destaque na categoria Iniciação Científica da I Semana Acadêmica e V Semana Científica, UFCSPA (2012)
- Trabalho destaque na categoria Inovação Tecnológica da I Semana Acadêmica e V Semana Científica, UFCSPA (2012)
- Trabalho Destaque na IV Semana Científica, UFCSPA (2011)

#### **5. IDIOMAS**

- Espanhol – intermediário
- Inglês – avançado

#### **6. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)**

- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY In: 11th International Conferences on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu. Program and Abstract Book of the 11th International Conferences on Environmental Mutagens. , 2013. v.1. p.264 – 265. Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
- ROCHA JC, BUSATTO, F. F., SAFFI J. Mitoxantrone induces lesions that are recognized by transcription-coupled nucleotide excision repair In: 11th International Conferences on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu. Program and Abstract Book of the 11th International Conferences on Environmental Mutagens. , 2013. v.1. p.266 – 267. Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY In: 10º Congresso Internacional de Biologia Celular, 2012, Rio de Janeiro. Livro de Resumos. , 2012. Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários
- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona In: VII Salão de Iniciação Científica e Extensão e I Mostra da Pós-Graduação, 2012, Porto Alegre. Revista Ciência em Movimento. , 2012. Referências adicionais : Brasil/Bretão. Meio de divulgação: Impresso

## 7. APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influence of Nucleotide Excision Repair in Mitoxantrone Citotoxicity, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho). Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Riocentro; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: 10º Congresso Internacional de Biologia Celular; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Biologia Celular
- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho). Palavras-chave: NER, Mitoxantrona, Inibidores de Topoisomerase II. Áreas do conhecimento : Genética Toxicológica. Referências adicionais : Brasil/Português; Local: UFRGS; Cidade: Porto Alegre; Evento: XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS; Inst.promotora/financiadora: UFRGS
- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho). Palavras-chave: NER, Mitoxantrona, Inibidores de Topoisomerase II. Referências adicionais : Brasil/Português; Local: IPA Metodista Sul; Cidade: Porto Alegre; Evento: VII Salão de Iniciação Científica e Extensão e I Mostra da Pós-Graduação; Inst.promotora/financiadora: IPA Metodista Sul.
- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho). Palavras-chave: NER, Mitoxantrona, Inibidores de Topoisomerase II. Áreas do conhecimento : Genética Toxicológica. Referências adicionais : Brasil/Português; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: V Semana Científica da UFCSPA; Inst.promotora/financiadora: UFCSPA.
- BUSATTO, F. F., SMIDERLE, L., LIMA, L. O., FIEGENBAUM, M., HUTZ, M.H., SAND, C. R. V. D., SAND, L. C. V. D., FERREIRA, M. E. W., PIRES, R. C., ALMEIDA, S. Farmacogenética dos Inibidores da HMG-CoA Redutase: Avaliação da Influência de Variantes de Genes Relacionados à Ação do Estrógeno na Resposta Hipolipemiante e no Desenvolvimento de Efeitos Adversos, 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho). Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação; Inst.promotora/financiadora: UFCSPA.

- BUSATTO, F. F., ROCHA JC, SAFFI J. Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona, 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho). Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação; Inst.promotora/financiadora: UFCSPA

## 8. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- Apresentação de Poster / Painel no(a) XI Congress of SBMCTA and IX Congress of ALAMCTA, 2013. (Congresso). INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) International Conference on Environmental Mutagens, 2013. (Congresso). INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) V Meeting in Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2013. (Encontro). INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) 10º Congresso Internacional de Biologia Celular, 2012. (Congresso). INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) VII Salão de Iniciação Científica e Extensão e I Mostra da Pós-Graduação, 2012. (Outra). Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) V Semana Científica da UFCSPA, 2012. (Outra). Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.
- XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012. (Outra). Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011. (Outra). Farmacogenética dos Inibidores da HMG-CoA Redutase: Avaliação da Influência de Variantes de

Genes Relacionados à Ação do Estrógeno na Resposta Hipolipemiante e no Desenvolvimento de Efeitos Adversos.

- II Simpósio de Pesquisa Clínica, 2011. (Simpósio)
- IV Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas da UFCSPA, 2011. (Outra)
- Encontro Internacional em terapia Celular e Engenharia de Tecidos, 2011. (Seminário)
- Apresentação de Poster / Painel no(a) III Semana Científica da UFCSPA, 2010. (Outra). Trabalhando na prevenção de incêndio através da capacitação de funcionários da UBS e da comunidade local.
- VI Jornada Acadêmica de Biomedicina UFCSPA e II Simpósio: Habilitações da Biomedicina, 2010. (Simpósio)
- V Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2010. (Congresso)
- XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010. (Congresso)
- VII Simpósio de Patologia Clínica - Aplicações da Patologia Clínica: uma visão global, 2009. (Simpósio)
- II Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas das UFCSPA, 2009. (Outra)
- II Semana Científica da UFCSPA, 2009. (Outra)
- V Jornada Acadêmica da Biomedicina e I Simpósio: Habilitação da Biomedicina da UFCSPA, 2009. (Simpósio)
- III Curso de Abordagem às Emergências Cotidianas - Liga do Trauma UFCSPA, 2009. (Outra)
- Curso de Perícia Criminal (Toxicologia Forense), 2009. (Outra)
- I Ciclo de Palestras sobre saúde e Meio Ambiente da UFCSPA, 2009. (Outra)
- Feiras de Saúde da UFCSPA, 2009. (Oficina)