



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Citotoxicidade, mutagenicidade e vias envolvidas na
reparação das lesões no DNA induzidas por complexos
organometálicos derivados do ácido valproico em
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado

Gabriel Berbigier Rodrigues

Porto Alegre

2017

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

**Citotoxicidade, mutagenicidade e vias envolvidas na
reparação das lesões no DNA induzidas por complexos
organometálicos derivados do ácido valproico em
*Saccharomyces cerevisiae***

GABRIEL BERBIGIER RODRIGUES

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 em Biologia Celular
e Molecular

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, outubro de 2017

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”

(Voltaire)

*Dedico este trabalho a mim mesmo, pois só eu sei o quanto foi difícil
conduzi-lo e finalmente concluí-lo*

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq - (projeto Universal nº 454929 / 2014-5), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Centro de Biotecnologia, Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da dissertação fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, desta Universidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. João Antonio Pêgas Henriques, por ter me dado a honra de sua orientação. Tenho muito orgulho de ter realizado este trabalho com este imortal da ciência. Um pesquisador de renome e que dispensa comentários. Além de ser um ser humano incrível, ético e sábio! Muito obrigado chefe!

Ao Dr. Iuri Marques de Oliveira, que me ensinou as técnicas, me acompanhou e ajudou em todos os momentos deste estudo. Desculpe se fui chato às vezes...!! Obrigado Dr. Iuri por ser, além de um grande cientista, um amigo de verdade! E que nossa amizade permaneça muito além dessa dissertação!

À Dra. Miriana Machado, pelos seus conselhos e conhecimentos técnicos que foram de grande valia!

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Tati, Michele, Vick, André, Grethel, José, Lyda, Larissa Milano, Jéssica, Priscila, pelos momentos de descontração e todo o apoio!

À Márcia Vaz, pelo apoio com os assuntos burocráticos do laboratório e por sua amizade!

Ao professor Dr. Diego Bonatto por fazer parte da minha comissão de acompanhamento.

Ao Professor Dr. Guido Lenz, pela revisão intelectual desta dissertação de mestrado.

Às Dras. Temenouga Guecheva e Miriam Benício pelas revisões indispensáveis do inglês e do português.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), pelos valiosos ensinamentos durante suas disciplinas.

À Silvia Regina Centeno, pelo companheirismo, apoio em todos os momentos bons e ruins, por ouvir minhas lamentações, minhas reclamações e sempre me fazer sorrir por pior que seja a situação. Por seu profissionalismo, o qual é indispensável para o PPGBCM ser de excelência! Agradeço principalmente por ser esta pessoa incrível, do bem, que contagia de alegria qualquer lugar que esteja! Ela não é apenas uma colega de trabalho, mas aquela amiga mais verdadeira, pura e sincera que possa existir! Uma segunda mãe, não biológica, mas a que Deus colocou em meu caminho! Obrigado por estar todos os dias ao meu lado, e que assim permaneça, aqui ou em qualquer lugar do mundo! Muito Obrigado Silvinha!

Ao Luciano Saucedo que colaborou durante boa parte do meu mestrado na secretaria do Centro de Biotecnologia (Cbiot).

Aos meus colegas servidores Jozi, Teresinha e Marquito pelo trabalho em equipe!

Aos meus pais João e Flávia, e minha avó Odesilda. As pessoas mais especiais e importantes da minha vida, que estão sempre ao meu lado e motivo por ser quem eu sou!

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, por me proporcionar a oportunidade de realizar meu mestrado e crescimento profissional. Agradeço, em especial, a todos os professores que ocuparam cargos de chefia, tanto no Cbiot quanto no PPGBCM. Agradeço também ao atual diretor, Professor Dr. Giancarlo Pasquali. Obrigado por todo o apoio!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar esta oportunidade de desenvolvimento intelectual, a partir de um ensino público e de qualidade.

E a todas aquelas pessoas cuja minha falta de memória não permitiu colocar os nomes no papel, mas que, em seu momento, foram uma grande ajuda para fazer este trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 11 |
| RESUMO | 13 |
| ABSTRACT | 14 |
| INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1. Ácido valproico (AV)..... | 16 |
| 1.1. Derivados organometálicos do ácido valproico | 19 |
| 2. Cobre e magnésio | 21 |
| 2.1. Cobre | 21 |
| 2.2. Magnésio | 22 |
| 3. Derivados do Ácido Valproico contendo cobre ou magnésio | 23 |
| 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico | 25 |
| 5. Mecanismos de reparação de DNA | 27 |
| 5.1. Reparação por Excisão de Bases (<i>Base Excision Repair – BER</i>) | 29 |
| 5.2. Reparação por Excisão de Nucleotídeos (<i>Nucleotide Excision Repair – NER</i>) | 31 |
| 5.3. Reparo Recombinacional | 34 |
| 5.3.1. Reparação Homóloga (<i>Homologous Repair – HR</i>) | 34 |
| 5.3.2. Reparação por Recombinação Não-Homóloga (<i>Non-homologous End- Joining – NHEJ</i>)..... | 37 |
| 5.4. Reparação Pós-Replicativa (<i>Post Replication Repair – PRR</i>) e Síntese de Translesão (<i>Translesion Synthesis – TLS</i>)..... | 39 |
| OBJETIVOS..... | 43 |
| Objetivo geral | 44 |
| Objetivos específicos | 44 |
| CAPÍTULO I..... | 45 |
| DISCUSSÃO | 73 |
| CONCLUSÕES | 81 |
| Conclusão geral..... | 82 |
| Conclusões específicas | 82 |
| PERSPECTIVAS | 83 |
| REFERÊNCIAS | 85 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estruturas químicas do ácido valproico e valproato de sódio..... | 17 |
| Figura 2: Estruturas químicas dos compostos organometálicos utilizados neste trabalho. | 25 |
| Figura 3: Reparação de DNA pelo sistema BER em <i>S. cerevisiae</i> | 31 |
| Figura 4: Reparação de DNA pelo sistema GG-NER em <i>S. cerevisiae</i> : | 33 |
| Figura 5: Reparação de DNA pelo sistema HR em <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| Figura 6: Reparação de DNA pelo sistema NHEJ em <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| Figura 7: Reparação de DNA pelos sistemas PRR e TLS em <i>S. cerevisiae</i> | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Derivados organometálicos do Ácido Valproico utilizados neste trabalho.... | 24 |
| Tabela 2: Principais proteínas do sistema BER em <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| Tabela 3: Principais proteínas do NER em <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| Tabela 4: Principais proteínas de reparo recombinacional em <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| Tabela 5: Principais proteínas do reparo pós replicativo em <i>S. cerevisiae</i> | 41 |
| Tabela 6: Resumo das proteínas participantes de cada via de reparação de DNA na resposta ao respectivo complexo | 80 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP-1:** *Activator protein 1*. Proteína de Ativação 1
- ATP:** *Adenosine Triphosphate*. Adenosina Trifosfato
- AV:** Ácido Valproico
- BER:** *Base Excision Repair*. Reparação por Excisão de Bases
- CD4:** *Cluster of Differentiation 4*. Grupamento de Diferenciação 4
- CPDs:** Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
- DDR:** *DNA Damage Response*. Resposta ao Dano no DNA
- D-loop:** *Displacement Loop*. Filamento Deslocado
- DNA:** *Deoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico
- DNA-PK:** Proteína Cinase Dependente de DNA
- DSBs:** *Double Strand Break*. Quebras de Fita Dupla de DNA
- dRP:** *5'-deoxyribose phosphate*
- DSBR:** *Double-Strand Break Repair*. Reparação de Quebras de Fita dupla
- EMA:** *European Medicine Agency*. Agência de Medicina Europeia
- ERO:** Espécies Reativas de Oxigênio
- FT-IR:** *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Espectroscopia Infravermelha de Transformação de Fourier
- GABA:** *Gamma-AminoButyric Acid*. Ácido Gama-Aminobutírico
- GGR:** *Global Genome Repair*. Reparo Global do Genoma por NER
- GSH:** *Glutamylcysteine Synthetase*. Glutamilcisteína Sintetase
- HIS:** Histidina
- HOM:** Homoserina
- HIV:** *Human Immunodeficiency Virus*. Vírus da Imunodeficiência Humana
- HDAC:** *Histone Deacetylases*. Desacetilase de Histonas
- HR:** *Homologous Repair*. Reparação Homóloga
- JH:** *Holliday Junction*. Junção de Holliday
- MgV:** *Magnesium Valproate*. Valproato de Magnésio
- MRX:** Complexo MRE11/RAD50/XRS2
- NMDA:** N-metil D-Aspartato
- NMR:** *Nuclear Magnetic Resonance*. Ressonância Magnética Nuclear
- NER:** *Nucleotide Excision Repair*. Reparação por Excisão de Nucleotídeos

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*. Reparação por Recombinação Não-Homóloga ou ilegítima

NPS: *NPS Pharmaceuticals, Inc.*

PRR: *Post Replication Repair*. Reparo Pós-replicativo

PPs: Pirimidinas/Pirimidonas

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*. Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase

RI: Radiação Ionizante

RPA: *Replication Protein A*. Proteína de Replicação A

Sítios AP: Sítios apurínico/apirimídico

SSB: *Single Strand Breaks*. Quebras de Fita Simples

ssDNA: *single-stranded DNA*. DNA de fita simples

SDSA: *Synthesis-Dependent Strand Annealing*. Síntese Dependente do Anelamento de Cadeia

TCR: *Transcription Coupled Repair*. Reparo por NER Acoplado à Transcrição

TLS: *Translesion Synthesis*. Síntese de Translesão

UV: Radiação Ultravioleta

XPC: *Xeroderma Pigmentosum C*

RESUMO

O Ácido Valproico (AV) é um fármaco antiepiléptico amplamente utilizado. Além disso, estudos recentes demonstram interessantes atividades antitumorais do AV contra diferentes tipos de tumores relacionado a sua atividade no remodelamento da cromatina. Entretanto, o uso do AV em pacientes possui limitações devido à sua reconhecida toxicidade sistêmica. Desta forma, é reforçada a necessidade do descobrimento de novos medicamentos com menor toxicidade e/ou maior efeito terapêutico. Para tanto, a estratégia mais sensata e econômica para se obter novos fármacos consiste em modificar quimicamente drogas já conhecidas. A síntese de complexos metálicos é uma abordagem recente para a obtenção de fármacos. Assim, neste trabalho foi analisado a citotoxicidade, mutagenicidade para o valproato de sódio (NaValp) e complexos de AV com Cu(II), Mg(II), 1,10-fenantrolina (Phen): [Cu₂(Valp)₄], [Cu(Valp)₂Phen] e [Mg(Valp)₂Phen] na levedura *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes em vias de reparo de excisão de base – BER (*apn1Δ*, *apn2Δ*, *ogg1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ*, *ntg2Δ*, *mag1Δ*), de excisão de nucleotídeos – NER (*rad1Δ*, *rad4Δ*, *rad10Δ*, *rad14Δ*), síntese de translesão – TLS (*rev1Δ*, *rev3Δ*, *rad30Δ*), reparação pós-replicação – PRR (*rad6Δ*, *rad18Δ*), recombinação homóloga – HR (*rad52Δ*) e junção final não homóloga – NHEJ (*rad50Δ*). Os resultados indicam que os complexos organometálicos têm maior citotoxicidade e são mais mutagênicos do que NaValp em fase de crescimento da levedura. Nos ensaios de mutagênese, não houve indução de mutação com NaValp, e os complexos organometálicos induziram substituições de pares de bases, identificadas pelo aumento da frequência de mutação nos loci *his1* e *lys1* na linhagem XV185-14C. As linhagens deficientes em proteínas da via BER foram sensíveis ao NaValp. Além disso, os danos no DNA causados pelo NaValp também podem ser tolerados pelas vias NER e TLS. As vias BER, NER, TLS, PRR e HR contribuíram com a tolerância ao dano induzido pelos complexos de cobre. O dano ao DNA induzido pelo complexo [Mg(Valp)₂Phen] pode ser tolerado pelas vias NER, TLS, PRR, HR e NHEJ, enquanto a presença de endonucleases de BER resulta em morte celular. Desta forma, nosso estudo revela uma importante contribuição das vias de reparo do DNA sobre a sensibilidade ao NaValp e aos complexos organometálicos, indicando sua potencial aplicação como agentes citotóxicos. Os mecanismos de reparação diferiram para os compostos, sugerindo que induzem diferentes lesões no DNA.

ABSTRACT

Valproic Acid (VA) is an antiepileptic drug largely used. In addition, recent studies present interesting antitumor activities of VA against different types of tumors related to its activity in chromatin remodeling. However, the use of VA in patients has limitations due to its recognized systemic toxicity. Thus, it is necessary to discover new drugs with less toxicity and/or greater therapeutic effect. For that, the most sensible and economical strategy to obtain new drugs is to chemically modify known drugs. The synthesis of metal complexes is a recent approach to obtaining drugs. Therefore, the cytotoxicity and mutagenicity were analyzed for sodium valproate (NaValp) and VA complexes with Cu(II), Mg(II) and 1,10-phenantroline (Phen): $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in repair pathways, like base excision repair – BER (*apn1Δ*, *apn2Δ*, *ogg1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ*, *ntg2Δ*, *mag1Δ*), nucleotide excision repair – NER (*rad1Δ*, *rad4Δ*, *rad10Δ*, *rad14Δ*), translesion synthesis – TLS (*rev1Δ*, *rev3Δ*, *rad30Δ*), post replicative repair – PRR (*rad6Δ*, *rad18Δ*), homologous recombination – HR (*rad52Δ*) e non-homologous end joining – NHEJ (*rad50Δ*). The results show that the organometallic complexes have higher cytotoxicity and are more mutagenic than NaValp in yeast growth phase. In the mutagenesis assay, there was not induction of mutation by the NaValp, whereas the organometallic complexes induced base pair substitutions, identified by the increase of mutation frequency in *his1* and *lys1* loci in the XV185-14C strain. The protein-deficient strains of the BER pathway were sensitive to NaValp. In addition, NER and TLS pathways can also tolerate DNA damage caused by NaValp. The BER, NER, TLS, PRR and HR pathways contributed to the damage tolerance induced by the copper complexes. DNA damage induced by $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complex can be tolerated by the NER, TLS, PRR, HR and NHEJ pathways, while the presence of BER endonucleases results in cell death. In this way, our study reveals an important contribution of the DNA repair pathways on sensitivity to NaValp and organometallic complexes, indicating the potential application as cytotoxic agents. The repair mechanisms are distinct for the compounds, suggesting that different lesions are induced in the DNA.



Introdução

Introdução

O desenvolvimento de um medicamento novo para uso em humanos é um processo que leva atualmente em torno de 15 anos e envolve um investimento de aproximadamente 2,6 bilhões de dólares (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). Dentre as razões que contribuem para este cenário, com o aumento da complexidade dos ensaios clínicos, destaca-se o fato de que um grande número de moléculas candidatas não são aprovadas durante o desenvolvimento pré-clínico ou clínico, sendo a toxicidade a principal causa de desaprovação de compostos (KRAMER; SAGARTZ; MORRIS, 2007; DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). Neste sentido, o redirecionamento e a remodelagem de fármacos já utilizados clinicamente tem despertado grande interesse na indústria farmacêutica. Considerando que tais produtos são amplamente conhecidos quanto à segurança toxicológica e possíveis efeitos adversos, ocorre um aumento nas chances de avanços nas fases pré-clínicas e clínicas de desenvolvimento, e estes fatores também contribuem para a diminuição dos custos e tempo de todo o processo (CRAG et.al., 2014). Segundo James Black, famoso farmacologista britânico ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1988, *“a base mais frutífera para a descoberta de um novo medicamento é começar com um medicamento antigo”* (BRADLEY, 2014).

1. Ácido valproico (AV)

O ácido valproico (ácido 2-propil-pentanoico, AV), também conhecido como valproado de sódio (NaValp, Figura 1), é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento da epilepsia em humanos nos últimos 40 anos (HREBACKOVA et al., 2010). O AV é um ácido carboxílico de cadeia ramificada com uma estrutura química muito similar aos ácidos graxos de cadeia curta (JOHANNESSEN; JOHANNESSEN, 2003), apresenta ampla atividade contra convulsões parciais ou generalizadas, atua como um estabilizador do humor no transtorno bipolar e esquizofrenia, e também é eficaz no tratamento de enxaqueca (NALIVAEVA et al., 2009).

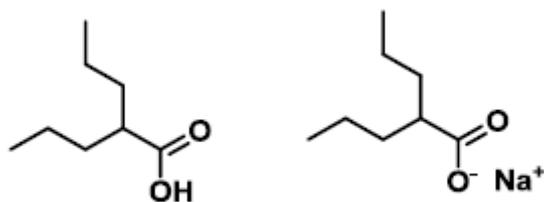


Figura 1: Estruturas químicas do ácido valproico (AV) e valproato de sódio (NaValp) (HREBACKOVA et al., 2010).

Embora o AV tenha sido descoberto por Buton em 1882, suas propriedades anticonvulsivantes foram reconhecidas somente em 1962 por Eymard (revisado em DUENAS-GONZALEZ et al., 2008). Dentre os principais mecanismos de ação envolvidos no efeito antiepilético do AV, está incluída a ação sobre o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (Gamma-AminoButyric Acid, GABA), potencializando sua atividade pela inibição da degradação ou aumento da síntese deste neurotransmissor (DUENAS-GONZALEZ et al., 2008). O AV também atua na modulação de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) e no bloqueio de canais de cálcio do tipo T e dependentes de voltagem (ZEISE et al., 1991; para revisão, ver FELISBINO et al., 2011). No entanto, o uso do AV no tratamento da epilepsia possui algumas limitações devido aos importantes efeitos adversos provocados por este medicamento. Com base em uma revisão sistemática recente (NEUMAN et al., 2013), as reações adversas mais comuns ao AV são apontadas como sendo hepatotoxicidade, toxicidade mitocondrial, encefalopatia, síndrome de hipersensibilidade, manifestações neurológicas, metabólicas e endócrinas. Metabolicamente, o AV interfere na fosforilação oxidativa na mitocôndria (LÖSCHER, 2002), gluconeogênese, ureiogênese (AIRES et al., 2011), catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e a oxidação de ácidos graxos (LUIS et al., 2011). Do ponto de vista morfológico, a hepatotoxicidade do AV em humanos apresenta esteatose microvesicular, necrose hepatocelular e lesões colestáticas. Bioquimicamente, a hepatotoxicidade ocorre por níveis elevados de aminotransferase, na presença ou ausência de bilirrubinemia. Além de sofrer glicuronidação e β -oxidação, o AV é também metabolizado pelo complexo enzimático citocromo (p450) para formar dois metabólitos (4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato) os quais são hepatotóxicos (para revisão, ver NEUMAN et al., 2013). NEUMAN et al. (2001) demonstraram *in vitro* que

os metabólitos do AV são mais tóxicos do que o composto original, principalmente em casos onde as enzimas do citocromo p450 foram induzidas.

A toxicidade do AV se manifesta de duas maneiras diferentes: toxicidade direta, a qual é dose dependente e muitas vezes assintomática, resolvida com ajustes de dose ou tratamento; e toxicidade indireta, a qual envolve a idiosincrasia metabólica (NANAU; NEUMAN, 2013). Além disso, o AV é também um agente teratogênico, induzindo defeitos na formação e fechamento do tubo neural e outras mal formações quando administrado durante o período gestacional. Foi descrita a síndrome do valproato, que ocorre em recém-nascidos de mães tratadas com AV, caracterizada por espinha bífida, anomalias craniofaciais e uma série de malformações menos frequentes (para revisão, ver TROJNAR et al., 2004). As malformações mais comuns induzidas pelo valproato são o desenvolvimento anormal do tubo neuronal e do esqueleto axial (OKADA et al., 2004).

A descoberta de um efeito inibitório do AV em histonas desacetilases (HDACs) proporcionou um avanço no entendimento de sua teratogenicidade, bem como o uso do composto no tratamento de câncer (PHIEL et al., 2001). A base molecular da teratogenicidade do AV pode ser explicada pela inibição direta de HDACs, já que o AV inibe diretamente as enzimas classe I e II de HDAC (LEHRMAN et al., 2005). A inibição da atividade de HDAC origina a hiperacetilação de genes promotores, alterando a expressão de aproximadamente 2 % do genoma (VAN LINT; EMILIANI; VERDIN, 1996). A inibição de HDAC também tem sido associada com a toxicidade celular de tumores (EYAL et al., 2005). O composto também foi testado em certos tipos de câncer e em humanos infectados com o vírus da imunodeficiência (HIV). A ação inibidora de HDACs pelo AV potencializa o tratamento para o HIV latente, já que HDAC1 é necessária para o gene do HIV permanecer escondido no DNA das células infectadas (DE FELICE et al., 2005). O AV pode estimular a liberação do vírus latente em de células-T CD4 infectadas *in vitro*, tornando o vírus mais acessível para ser atacado pelos antirretrovirais (YLISASTIGUI et al., 2004; SMITH, 2005). Estudos demonstraram que a carga viral diminuiu significativamente após o tratamento combinado com AV e terapia antiretroviral altamente ativa (para revisão, ver LEHRMAN et al., 2005 e MINUCCI; PELICCI, 2006).

A ação do AV sobre a estrutura da cromatina, que modifica a expressão gênica em astrócitos e neurônios por inibir as HDACs, induziu a realização de amplo estudo nos últimos anos (MARINOVA et al., 2011). Ressalta-se a influência do AV sobre as

enzimas HDACs, que foi identificada em diferentes tipos de tumores *in vitro* e *in vivo*, propriedade que está sendo sugerida como o principal mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral do AV. O AV é capaz de alterar a expressão de HDAC1 em câncer de próstata, gástrico, de esôfago, de cólon, mama e pulmão. Em outros tipos de tumores, como colorretal, cervical e gástrico, o AV induz alterações na expressão de HDAC2. Em neuroblastomas, o AV influencia a expressão de HDAC8 (HUANG et al., 2005; DUENAS-GONZALEZ et al., 2008; HREBACKOVA et al., 2010). ARINZE & KAWAI (2003) verificaram que o AV também pode modular diferentes vias de sinalização celular e fatores de transcrição que estão envolvidas nos efeitos transcricionais causados por ele, como o ativador da proteína AP1 e membros da família *Sp*.

1.1. Derivados organometálicos do ácido valproico

Reações de hipersensibilidade a medicamentos são efeitos adversos raros, restritos a um subgrupo de pacientes vulneráveis e também a produtos farmacêuticos, incluindo o AV. No entanto, embora com uma baixa incidência, estas reações podem levar a consequências graves e potencialmente fatais, tendo um enorme impacto na prática clínica e na saúde pública (NANAU; NEUMAN, 2013). Muitos fármacos antiepilépticos comercialmente disponíveis são teratogênicos, tais como os benzodiazepínicos, barbitúricos, além do AV, levando a uma limitação de seus usos por mulheres em idade fértil. Com isso, em novembro de 2014, a Agência de Medicina Europeia (EMA) decidiu reforçar a advertência do uso do AV por mulheres grávidas pelo risco de mal formação fetal e problemas no desenvolvimento, o que pode estar associado ao autismo infantil (para revisão, ver WLODARCZYK et al., 2015)

O AV é uma molécula simples e, portanto, útil, barata e bastante disponível. Sendo assim, o AV torna-se uma molécula de partida para a síntese de uma variedade de derivados com atividade potencial no sistema nervoso central. Modificações químicas e o desenvolvimento de derivados análogos do AV mostram-se promissores no tratamento mais eficaz e eficiente de epilepsia, dores, transtorno bipolar, entre outras doenças neurológicas (BIALER; YAGEN, 2007). Como o AV é um dos medicamentos antiepiléticos que apresenta um baixo custo-benefício considerando a eficácia moderada e alta toxicidade, torna-se interessante o desenvolvimento de análogos que apresentem um efeito superior ao composto protótipo e que não apresente teratogenicidade

(revisado em BIALER; YAGEN, 2007). EYAL e colaboradores (2005) avaliaram cinco derivados do AV (ácido valnóico, ácido propilisopropilacético, ácido disopropilacético, ácido ciclopropilacético e ácido tetrametilciclopropanocarboxílico) e seus subprodutos quanto ao potencial de desacetilação de histonas e citotoxicidade em linhagens de melanoma e de câncer de cólon (EYAL et al., 2005). Neste estudo, todos os derivados analisados apresentaram efeitos citotóxicos inferiores aos demonstrados pelo AV. No entanto, quanto à propriedade de desacetilação de histonas, os derivados não mostraram atividade superior ao AV, o que sugere que o AV apresenta um melhor desempenho como agente antitumoral em relação às moléculas derivadas (EYAL et al., 2005). Existem outros exemplos, como valnoctamida, diisopropilacetamida, valroceamida (*valproylglycinamide*), N-2,2,3,3-pentametilmetilciclopropanocarboxamida, 2,2,3,3-tetrametil ciclopropil carbonil urea, isovaleramida (NPS-1776) e o ácido arúndico, que possuem efeitos menos citotóxicos e mais eficientes que o AV em si. Também, além de ser um medicamento epiléptico efetivo, o AV inibe a angiogênese tanto *in vitro* como *in vivo* (EL-FAHAM et al., 2014).

Nos últimos anos, existe uma ênfase maior no estudo da associação de metais à moléculas orgânicas, com o objetivo de obter novos agentes citotóxicos de amplo espectro. Os metais podem coordenar ligações em configurações tridimensionais precisas, permitindo, assim, a “montagem” de moléculas que reconheçam e interajam com alvos moleculares específicos (MEGGERS, 2009). Além disso, os complexos metálicos sofrem facilmente reações redox e substituição de ligações, o que lhes permite interagir mais eficientemente com moléculas biológicas. O estudo de derivados organometálicos está focado em complexos biologicamente ativos formados por íons essenciais, como o cobre e o magnésio. Uma vez que qualquer metal essencial não está em sua via metabólica normal, ele pode ser muito tóxico para o organismo. Complexos metálicos podem servir como agentes citotóxicos eficazes (COHEN, 2007).

Ainda, a inclusão de compostos metálicos como ligantes em moléculas farmacologicamente ativas, como por exemplo, medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais e antitumorais, tem mostrado resultados importantes na melhoria da eficácia terapêutica destes agentes (para revisão, ver SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009; SANTINI et al., 2014).

2. Cobre e magnésio

2.1. Cobre

O cobre é um metal essencial para a fisiologia celular, com funções fundamentais na respiração, atividade antioxidante, integridade dos tecidos e funções sinápticas, e também tem um importante papel na sinalização celular. Devido a sua potente ação redox, esse metal tem sido considerado essencial na sinalização celular, relacionado à modulação das interações receptor-ligante na membrana celular e no controle das funções fosfatase-quinases, estando associado em muitas vias de sinalização e no controle da expressão do gene (HORDYJEWSKA; POPIOŁEK; KOCOT, 2014). A homeostasia do cobre pode ser importante para estratégias terapêuticas no tratamento do câncer, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias (para revisão, ver GRUBMAN; WHITE, 2014). Todos os organismos requerem cobre como um cofator catalítico de processos biológicos como a respiração, transporte de ferro, proteção contra estresse oxidativo, produção do hormônio peptídeo, pigmentação, coagulação sanguínea, crescimento celular normal e desenvolvimento. Contudo, esse metal também participa de reações redox, que geram radicais hidroxil, os quais causam danos significativos a lipídeos, proteínas e ao DNA (para revisão, ver PUIG; THIELE, 2002).

O interesse nos complexos de cobre tem origem no uso destes como potenciais agentes antimicrobianos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais e inibidores enzimáticos. É provável que os complexos de cobre interajam com enzimas e inibam funções celulares, em vez de interagir com o DNA, levando a formação de ligações cruzadas (*crosslinks*) DNA-metal (para revisão, ver IAKOVIDIS et al., 2011). Por exemplo, os quelatos de salicilaldoxima Cu(II) são potentes agentes antiproliferativos, com forte efeito citotóxico quando comparado à adriamicina, induzindo parada de ciclo celular e apoptose (FREZZA et al., 2010). A ação destes compostos pode estar associada com a inibição da enzima topoisomerase II, por prevenir a formação de dímeros da enzima e sua reação com o DNA. Os complexos cloreto de 2,6-bis(benzimidazol-2-il) pirimidina Cu(II) mostraram ter atividade de metaloprotease, cujo mecanismo catalítico envolve o metal. Complexos *decarboxyamidrazones* apresentam elevada atividade antiproliferativa contra células de melanoma em ratos (B16F10). Também, a combinação de cobre com *decarboxyamidrazones* pode facilitar o transporte intracelular e bloquear receptores de estrogênio (FERNANDES et al., 2012).

Complexos de cobre e ligantes como a fenantrolina ou 2,2-bipirimidina apresentam atividade antineoplásica significativa *in vitro* e *in vivo*, quando testadas em uma variedade de linhagens tumorais (FREZZA et al., 2010).

O cobre, sendo um metal essencial, pode ser menos tóxico do que metais não essenciais como a platina, e moléculas organometálicas com cobre vêm sendo amplamente investigadas com propósitos diversos: como antimalárico, antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatório (sobretudo artrite reumatoide), cicatrizante e hipoglicêmico (KOWOL et al., 2012). Outro campo de estudo está no tratamento de patologias neurológicas como Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e Alzheimer, devido ao seu potencial neuroprotetor (MEDICI et al., 2015). E, nesta última década, várias famílias de complexos de cobre estão sendo estudados como potentes agentes antitumorais (MARZANO et al., 2009).

2.2. Magnésio

O Magnésio é o segundo íon intracelular mais comum no corpo humano. Atua como um cofator em aproximadamente 300 enzimas relacionadas ao metabolismo de energia celular, envolvendo ATP, bomba de Na^+/K^+ , canais de cálcio, estabilização de membranas celulares e na DNA/RNA polimerase (TONG; RUDE, 2005; BATEMAN, 2017). Existe um grupo de receptores de glutamato nos quais sua estimulação leva a um potencial excitatório pós-sináptico causando convulsões, e foi demonstrado que o uso do magnésio impediu a estimulação desses receptores, sendo um anticonvulsivante promissor, principalmente em eclampsia (SARIS et al., 2000; BAKER, 2016). Llorente e colaboradores (1996) verificaram que o magnésio atua como uma ponte entre o antibiótico quilonona e grupos fosfatase, intercalando a quilonona na dupla hélice do DNA. A estrutura é estabilizada pela ligação do íon magnésio com átomos de oxigênio presente na quilonona, uma fosfatase e uma base púrica do DNA (para revisão, ver TUREL et al., 2000). Esse metal é requerido para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, no ciclo celular, integridade do citoesqueleto e da mitocôndria, e para a ligação de substratos na membrana plasmática; modula o transporte de íons através de bombas, transportadores e canais. Com isso, auxilia na transdução de sinais e nas concentrações citosólicas de cálcio e de potássio (para revisão, ver SARIS et al., 2000; BAKER, 2016).

No sistema nervoso, o magnésio tem um efeito depressivo nas sinapses e tem sido usado com um anticonvulsivante. O mecanismo de ação nas sinapses está relacionado com a competição entre o cálcio e o magnésio no estímulo da liberação do neurotransmissor, ou seja, na inibição pré-sináptica da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (SAITO et al., 2016). A deficiência de magnésio pode causar excesso de atividade dos receptores de NMDA, perda de fluidez celular e diminuição da liberação de cálcio, podendo refletir na demência, síndrome das pernas inquietas e síndrome da fadiga crônica (para revisão, ver FAWCETT et al., 1999; KRUIS; PHUONG NGUYEN, 2016).

3. Derivados do Ácido Valproico contendo cobre ou magnésio

Atualmente, as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de epilepsia não contemplam fármacos organometálicos. No entanto, novos complexos do AV com íons de cobre divalente apresentaram efeitos terapêuticos muito superiores ao composto parental. Como exemplo, tem-se o estudo realizado por SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al. (2009), no qual o composto bisvalproato (2-propilpentanoato) (1,10-fenantrolina) Cu(II): [Cu(Valp)₂phen] protegeu ratos contra Convulsões Clônicas Mínicas (*Minimal Clonic Seizure – MCS*) (DE₅₀ 8 µmol/Kg) e apresentou atividade anticonvulsivante contra Eletrochoque Máximo (*Maximal Electroshock – MES*) (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009). Portanto, nesse estudo, o complexo [Cu(Valp)₂phen] induziu efeito anticonvulsivo superior ao AV, mas sem aumentar a sua toxicidade nos animais expostos (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009).

RAGHUNATHAN e colaboradores (2017) testaram o composto valproato de magnésio (MgV) a fim de controlar a hipertrofia cardíaca. O composto é um inibidor de HDAC classe I (HDACI) cinco vezes mais potente que a tricostatina A, clinicamente utilizada. A inibição seletiva de HDACI é necessária para controlar a hipertrofia cardíaca, uma vez que não existem inibidores de HDAC específicos de classe I e classe II clinicamente disponíveis. Neste estudo, ocorreu a supressão do gene *Inpp5f* devido à super expressão de HDAC2, ativando a via Akt-Gsk3β da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), ocasionando, assim, hipertrofia cardíaca (RAGHUNATHAN; GOYAL; PATEL, 2017).

É importante ressaltar o estudo de GOLLA e colaboradores (2016), onde foi verificado que o AV induz alterações na expressão de genes envolvidos na reparação de DNA em levedura. Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar as propriedades biológicas *in vitro* em relação à citotoxicidade, mutagenicidade e reparação de DNA do AV em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, realizando uma análise comparativa ao protótipo ácido valproico. Basicamente, os compostos a serem avaliados $[Cu_2(Valp)_4]$, $[Cu(Valp)_2phen]$ e $[Mg(Valp)_2Phen]$ variam entre si quanto ao número de moléculas de AV e quanto à presença ou não do ligante no complexo. Dois compostos apresentam como sal metálico o átomo de cobre e um o átomo de magnésio. As características químicas dos compostos estão descritas na Tabela 1 e ilustradas na Figura 2, para $[Cu_2(Valp)_4]$, $[Cu(Valp)_2phen]$ e $[Mg(Valp)_2Phen]$.

Tabela 1: Derivados organometálicos do Ácido Valproico utilizados neste trabalho

| Nome | Estrutura Molecular | Massa Molecular |
|--------------------|------------------------|-----------------|
| $[Cu_2(Valp)_4]$ | $C_{32}H_{60}Cu_2O_8$ | 699,40 g/mol |
| $[Cu(Valp)_2phen]$ | $C_{28}H_{38}CuN_2O_4$ | 530,17 g/mol |
| $[Mg(Valp)_2Phen]$ | $C_{28}H_{38}MgN_2O_4$ | 490,90 g/mol |

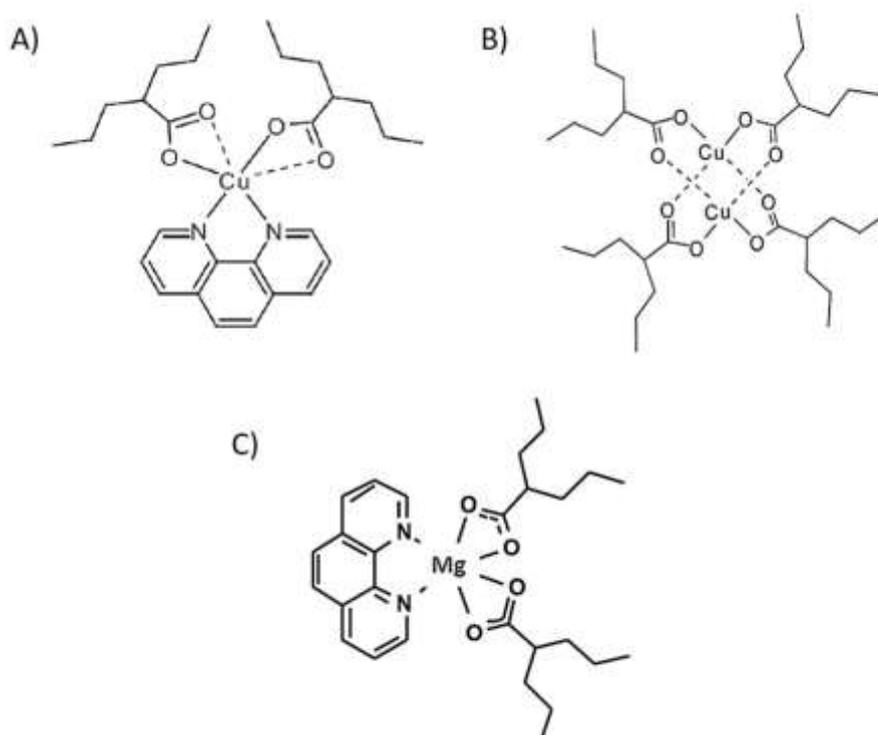


Figura 2: Estruturas químicas dos compostos organometálicos utilizados neste trabalho. A) [Cu₂(Valp)₄]; B) [Cu(Valp)₂Phen]; e C) [Mg(Valp)₂Phen] (VEITIA, DUMAS, MORGANT, 2012).

4. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico

A escolha da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo no presente trabalho foi baseada em diversos aspectos. A *S. cerevisiae* é um fungo unicelular com ciclo eucariótico típico e completo, já amplamente estudado, o que o tornou uma ferramenta importante nas pesquisas biológicas em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos. Dessa maneira, esse organismo é um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas, principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (LAFON et al., 2007; MILLER-FLEMING et al., 2008; PEROCCHI et al., 2008; VALENTE et al., 2009; CHI; TAO; LIU, 2015; MONERAWELA; BOND, 2017). Além disso, linhagens de *S. cerevisiae* são frequentemente empregadas nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica e na tecnologia ambiental, com fins de biorremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (PENNACCHIA et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2009; SHIBASAKI et al., 2009; DEVER; KINZY; PAVITT, 2016)

Algumas das propriedades que fazem a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, o fato de possuir um sistema genético bem definido e, mais significativamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente sequenciado e depositado em bases de dados especializadas (como <http://www.yeastgenome.org>). Também, existem ferramentas moleculares apropriadas para manipulação gênica e estudos de expressão, como o transcriptoma, proteoma, metaboloma, lipidoma e interactoma (GIBSON; GOLDBERG, 2009; XU et al., 2015; EL DAROV et al., 2016)

A levedura é geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA em pesquisas sobre mutagênese e reparação de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo e homeostase

metálica (HERRERO et al., 2008; ACEVEDO-TORRES et al., 2009; BAUER; CORBETT; DOETSCH, 2015; LI; LI, 2017).

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias. Esses testes são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (KIRPNICK et al., 2005; TOUSSAINT; CONCONI, 2006; VOORDECKERS; VERSTREPEN, 2015; CHENG et al., 2017).

Para avaliação de danos ao DNA, experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes baseiam-se na restauração ou compensação de um dano em um gene responsável por um requerimento nutricional (ZIMMERMANN; VIG, 1975; ZARIN; MOSES, 2014). A restauração acontece por uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos “*nonsense*”. Para que seja identificada a mutação reversa, é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide XV185-14c (ZIMMERMANN et al., 1984; DUJON, 2010; WYRICK; ROBERTS, 2015). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações *locus* específicas: reversões do alelo *lys1-1* ou do alelo *his1-7*, ocorrendo por mutações de sentido incorreto “*missense*” e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA “*frameshift*” verificadas no *locus hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo somente um “background” de crescimento (ZIMMERMANN; VIG, 1975; KNIGHT et al., 2007; WYRICK; ROBERTS, 2015; BHAVSAR-JOG; BI, 2016).

Além da resposta mutagênica e recombinogênica, os ensaios em levedura permitem investigar os mecanismos moleculares envolvidos na geração e reparação do dano. Para determinar a natureza das lesões geradas por um determinado agente, compara-se a citotoxicidade de compostos em mutantes deficientes em uma ou mais vias de reparação de DNA com a respectiva linhagem isogênica proficiente na via de

reparação. Quando um mutante deficiente em uma via de reparação do DNA apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem proficiente na reparação, pode-se inferir que a substância estudada induz o tipo de lesão incapaz de ser reparada pela mutante (SEIPLE et al., 2006; VASCONCELLOS et al., 2007; GUINTINI et al., 2015; CHALISSERY et al., 2017).

Dessa maneira, diversos laboratórios em todo o mundo já utilizaram este organismo como modelo de estudo, sendo uma excelente ferramenta para desenvolvimento de modelos de biologia celular, molecular e genética (GIBSON; GOLDBERG, 2009; LORENZ et al., 2009; BILLINGSLEY; DENICOLA; TANG, 2016).

5. Mecanismos de reparação de DNA

Alterações estruturais no DNA afetam severamente suas funções, incluindo a replicação e transcrição. Diante de vários tipos de lesões, um mecanismo complexo de Resposta ao Dano no DNA (*DNA Damage Response – DDR*) é ativado em uma rede de sinalização mediada pela enzima cinase. Através desse mecanismo molecular, células podem detectar os danos e transmitir sinais para recrutar elementos de reparação ao sítio do dano, e finalmente reparar, ou como alternativa, ativar o Ponto de Checagem (*Checkpoint*) de ciclo celular ou a apoptose, no caso de danos irreparáveis (para revisão, ver TIAN et al., 2015). Devido ao papel central do DDR na manutenção da estabilidade e integridade do genoma, mecanismos precisos de regulação são requeridos para os processos de reparação, em resposta aos diferentes tipos de danos em vários estágios do ciclo celular (BROWN; JACKSON, 2015).

Exposições a estresses endógenos e exógenos, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO), radiações ionizantes (RI) e radiação ultravioleta (UV), assim como agentes rádio e quimioterápicos, podem causar danos ao DNA na forma de mutações, adutos de base, erros de emparelhamento (*Mismatch*), formação de alquil guanina O6, quebras de cadeia dupla (*Double Strand Breaks – DSBs*), quebras de cadeia simples (*Single Strand Breaks – SSBs*), inserções, deleções e rearranjos cromossômicos. Esses eventos podem ocorrer após a divisão celular ou durante a replicação do DNA (O'CONNOR, 2015). O DDR é conservado em todos os organismos para a manutenção da integridade genômica e consistem em proteínas que trabalham em diferentes estágios

como sensores, mediadores, transdutores e efetores no processo de reparação (HOWARD et al., 2015).

Quando carcinógenos ou radiações provocam lesões no DNA genômico, há o comprometimento da integridade genômica e aumentam as chances da ocorrência de mutações que, conseqüentemente, causam doenças como o câncer. A radiação UV tipicamente induz adutos no DNA, principalmente foto produtos de pirimidina (6–4), pirimidona (6–4PPs) e dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs). Caso estas lesões não forem reparadas devidamente, podem resultar em mutações permanentes. Diante disso, as células desenvolveram uma variedade de vias de reparação para remover as mais variadas lesões que afetam o DNA (revisado de NEMZOW et al., 2015).

Assim, os danos no DNA podem ser reparados pelos mecanismos de Reparação por Excisão de Bases (*Base Excision Repair* – BER), Reparação por Excisão de Nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair* – NER), Reparação Homóloga (*Homologous Repair* – HR), Reparação não-Homóloga (*Non-homologous End-Joining* – NHEJ) e Reparações Pós Replicativas (*Post Replications Repair* – PRR). BER atua na remoção de modificações químicas no DNA ou nucleotídeos simples que foram alterados por oxidação, alquilação, desaminação ou metilação (HOEIJMAKERS, 2009; DIANOV; HUBSCHER, 2013). NER é requerido, sobretudo, quando ocorre o bloqueio da transcrição, principalmente em lesões que causam distorções na dupla hélice do DNA, tais como dímeros de pirimidina e ligações cruzadas intracadeia (JEPPESEN; BOHR; STEVNSNER, 2011). As reparações homóloga e não-homóloga são os principais mecanismos de reparação para remover os danos mais tóxicos e difíceis de reparar no DNA, as DSBs. A HR predomina na fase S do ciclo celular e requer uma sequência de DNA homóloga para uma reparação livre de erros, e a NHEJ predomina na fase G1 do ciclo celular e não requer uma sequência homóloga para a reparação, sendo propensa a erros (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; HANAMSHET; MAZINA; MAZIN, 2016).

Além dos mecanismos de reparação, existe o processo de tolerância a danos, chamado de síntese de translesão (*Translesion Synthesis* – TLS), que é uma reparação pós-replicativa, no qual o dano não é efetivamente reparado (*by-pass*), sujeita a erro e que, mesmo assim, permite a conclusão da replicação (ANDERSEN; XU; XIAO, 2008; JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; DE WIND, 2015).

5.1. Reparação por Excisão de Bases (*Base Excision Repair – BER*)

BER repara alterações de bases únicas, muitas vezes resultado de danos oxidativos, metilação, desaminação, alquilação ou ainda bases que foram erroneamente incorporadas durante a replicação que geralmente não causam, ou causam pouca, distorção na dupla hélice do DNA, ao contrário das lesões reparadas por GG-NER (MÉNDEZ-ACUÑA et al., 2010; DIANOV; HUBSCHER, 2013). Estresses endógenos ao DNA são principalmente reparados por BER. De acordo com modelos atuais, BER inicia-se pelo reconhecimento e remoção da base modificada por uma DNA glicosilase específica ao hidrolisar a ligação glicosídica entre a base e a cadeia desoxirribose-fosfato, gerando um sítio apurínico/apirimídico (AP), que tem sua ligação fosfodiéster clivada na fita 5' por uma AP endonuclease ou DNA glicosilase AP liase, gerando uma SSB que contém um resíduo hidroxil na região terminal 3' e uma desoxirribose fosfato na região terminal 5'. Depois da clivagem da região terminal 5' dRP, a lacuna formada pelo nucleotídeo excisado é preenchida por uma DNA polimerase livre de erro e, por fim, as extremidades são seladas pela enzima DNA-ligase (ROGER et al., 2006; DIANOV; HUBSCHER, 2013).

Existem duas vias no BER: uma menor, que remove apenas um nucleotídeo, e uma maior, onde são substituídos de 2 a 13 nucleotídeos, dependendo do tipo da lesão (ATAIAN; KREBS, 2006; ABBOTTS; WILSON, 2016).

O reparo por BER em *S. cerevisiae* está ilustrado na Figura 3 e as principais proteínas envolvidas nesta via estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Principais proteínas do sistema BER em *S. cerevisiae*

| Proteína | Função | Referência |
|----------|--|--|
| Apn1 | Principal AP endonuclease. Envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes oxidativos e alquilantes. Também possui funções como uma exonuclease 3'-5' para reparar danos do tipo 8-oxoguanina; geneticamente, interage com Ntg1 para manter a integridade do genoma mitocondrial. | (ISHCHENKO et al., 2005) (PHADNIS et al., 2006) |
| Apn2 | AP endonuclease, envolvida na reparação por excisão de bases no DNA. | (UNK et al., 2000) |
| Rad27 | ‘Flap’ endonuclease com atividade 5' – 3' exonuclease. | Rad27 (SOMMER et al., 2008) |

| | | |
|------|---|--|
| | codifica uma nuclease multifuncional envolvida no processamento de fragmentos de Okazaki durante a replicação do DNA, reparação de excisão de base (BER) e manutenção da estabilidade do genoma. A sua atividade de endonuclease de extremidade 5' é necessária para clivar a aba 5' de fragmentos de Okazaki, que é gerada durante a síntese da cadeia, e para remover a extremidade de 5'-desoxirribosefosfato, que é formada em sítios AP durante BER. A exonuclease 5' - 3' de Rad27p está envolvida na prevenção da expansão das repetições di e trinucleotídicas por remoção de estruturas secundárias que são formadas pelas sequências repetidas. | (SPARKS et al., 2012) (DASTIDAR et al., 2012) |
| Ogg1 | DNA glicosilase e AP liase que excisa danos do tipo 8-oxoguanina. Contribui para a resistência a UVA. | (SINGH et al., 2001) (KOZMIN et al., 2005) |
| Mag1 | DNA glicosilase 3-metil-adenina. Envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes alquilantes. Inicia o reparo de excisão de base removendo bases danificadas para criar sítios abásicos que são posteriormente reparados. | (TKACH et al., 2012) |
| Ntg1 | DNA glicosilase e AP liase. Atua no núcleo e na mitocôndria. Envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes oxidativos. | (PHADNIS et al., 2006) (GRIFFITHS et al., 2009) |
| Ntg2 | DNA glicosilase e AP liase que atua no núcleo. Paráloga de Ntg1. | (MEADOWS; SONG; DOETSCH, 2003) (GRIFFITHS et al., 2009) |

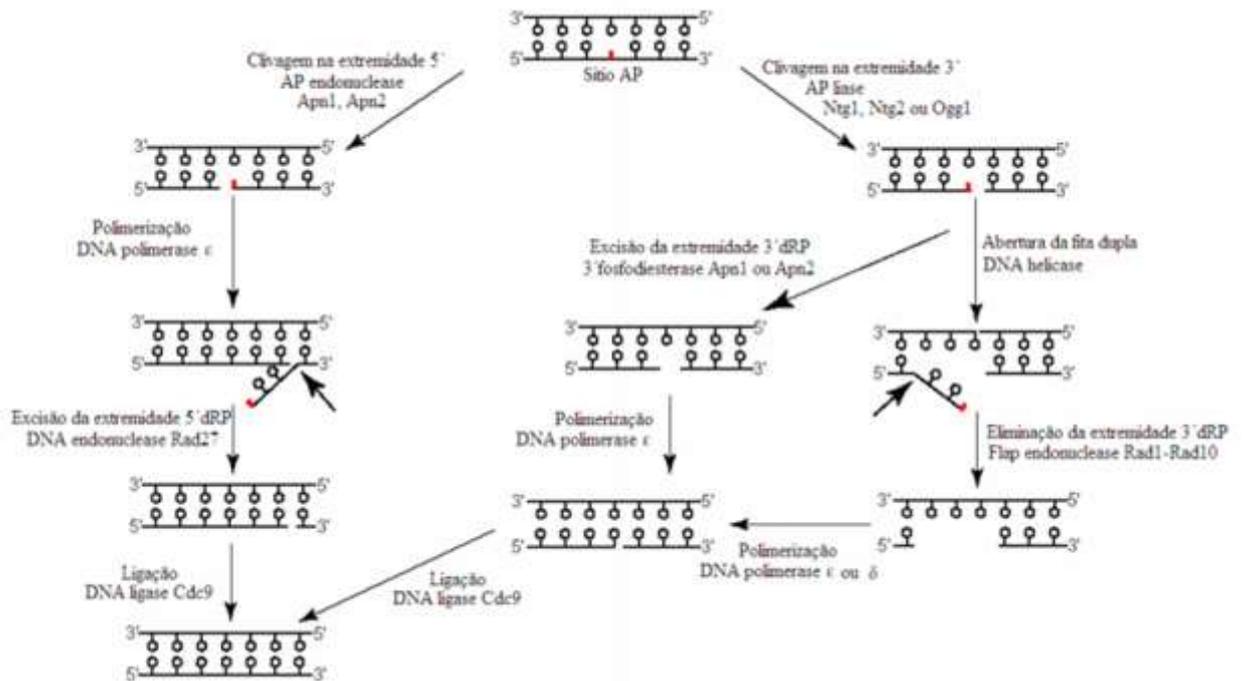


Figura 3: Reparação de DNA pelo sistema BER em *S. cerevisiae*. Esquerda: a reparação por BER ocorre preferencialmente via AP endonuclease (Apn1p), DNA polimerase (Pol ξ). 5' flap endonuclease (Rad27p) e uma DNA ligase (Cdc9p). Direita: alternativamente, uma fração menor de sítios AP é clivada por AP liases (Ntg1p, Ntg2p ou Ogg1p), seguida por Apn1p ou Apn2p. Alternativamente, a clivagem pode ocorrer por Rad1p-Rad10p endonuclease. Adaptado de CHALISSERY et al. (2017).

5.2. Reparação por Excisão de Nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair – NER*)

NER é uma via de reparo livre de erros, requerida quando ocorre o bloqueio da transcrição, principalmente em lesões que causam grandes distorções na dupla hélice do DNA, tais como dímeros de pirimidina ciclobutano – CPD e 6-4-pirimidina pirimidona – 6-4-PP (fotoadutos gerados pela radiação UV), adutos gerados por ROS e pontes inter e intracadeia de DNA (HOEIJMAKERS, 2009; JEPPESEN; BOHR; STEVNSNER, 2011). As duas subvias que reconhecem o dano em NER são: NER de genoma global (*Global Genome NER – GG-NER*), que explora o genoma para reparar lesões maiores no DNA em regiões não transcritas de DNA, e NER acoplado a transcrição (*Transcription Coupled NER – TC-NER*), que reconhece especificamente lesões que bloqueiam a transcrição, reparando lesões em fitas transcritas de genes expressos. Ambas as sub vias de NER diferem-se nas proteínas que reconhecem as lesões

(PALOMERA-SANCHEZ; ZURITA, 2011; JEPPESEN; BOHR; STEVNSNER, 2011; PARK; KANG, 2016).

Na via NER, de maneira geral, o complexo de excisão reconhece a lesão e remove um fragmento de DNA de 22-30 nucleotídeos que contém o dano, produzindo DNA de cadeia simples (*ssDNA – single strand DNA*); DNA polimerases e fatores associados sintetizam novamente a cadeia de DNA e a ligase sela as extremidades (ROGER et al., 2006; LIU; LEE; ZHOU, 2010). A proteína de levedura Rad (*Radiation Sensitive*) 4 (Rad4) e a proteína ortóloga humana XPC (*Xeroderma Pigmentosum*), junto com suas subunidades acessórias, são identificadas como os complexos de proteínas envolvidos principalmente no reconhecimento de lesões no DNA que recrutam outras proteínas de reparação. Assim, Rad4p e XPC são responsáveis pelo início do GG-NER. A proteína Rad4p é encontrada em complexos com Rad23p e, quando Rad4p se liga ao dano no DNA, a via NER é acionada (revisado de (MIN; PAVLETICH, 2007; PARK; KANG, 2016).

A Tabela 3 e a Figura 4 apresentam as principais proteínas envolvidas no NER em *S. cerevisiae* e as vias envolvidas neste sistema de reparação.

Tabela 3: Principais proteínas do NER em *S. cerevisiae*

| Proteína | Função | Referência |
|----------|--|---|
| Rad1 | Endonuclease de cadeia simples que cliva a extremidade 5' do oligonucleotídeo que contém a lesão, junto com Rad10. | (PRAKASH; PRAKASH, 2000) (SYMINGTON, 2002) |
| Rad4 | Proteína que reconhece e se liga ao dano no DNA juntamente com Rad23, atuando na dobra de proteínas ubiquitinadas. Rad4 e Rad23 formam um complexo estequiométrico chamado NEF2, que é requerido em NER. NEF2 (<i>NER factor 2</i>) se liga especificamente a danos UV no DNA. Mutantes rad4 são extremamente sensíveis a UV e completamente deficientes em NER. | (LI et al., 2010) (ZHOU et al., 2015) |
| Rad10 | Endonuclease de cadeia simples que cliva a extremidade 5' do oligonucleotídeo, junto | (PRAKASH; PRAKASH, 2000) (SYMINGTON, 2002) |

com Rad1.

Proteína que reconhece e se liga ao dano. (PRAKASH; PRAKASH, 2000)

Rad14
Subunidade de NEF1 que contém motivo de
dedo de zinco.

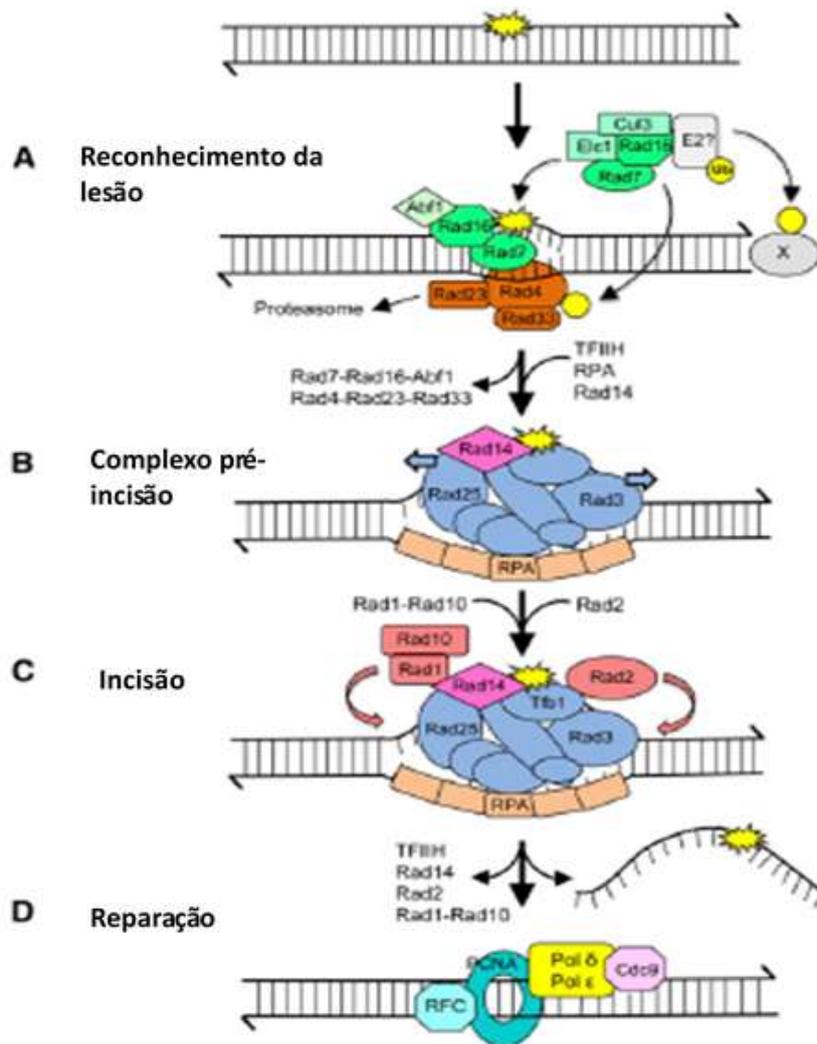


Figura 4: Reparação de DNA pelo sistema GG-NER em *S. cerevisiae*: A) a lesão no DNA (em amarelo) é reconhecida pelos complexos Rad4p-Rad23p-Rad33p e Rad7p-Rad16p. Rad7p-Rad16p-Abf1p tem atividade de remodelador da cromatina, enquanto Rad7p-Rad16p-Elc1p-Cul3p-E2 tem atividade de ubiquina ligase, que modifica Rad4p e fatores adicionais (“X”). Essas reações permitem um eficiente reconhecimento das lesões por Rad4, e seu posicionamento adequado permite a abertura da hélice; B) TFIIH (em azul), Rad4 e RPA são recrutados para formar um complexo de pré-incisão, que

verifica a lesão e desenrola ainda mais o DNA. Rad4p-Rad23p-Rad33p e Rad7p-Rad16p-Abf1p são liberados; C) as endonucleases Rad1p-Rad10p e Rad2p estão posicionadas para incisar as regiões 5' e 3' da lesão, respectivamente; D) um oligonucleótido contendo lesão (25-30 nt) é libertado do duplex, seguido pela síntese de reparação e ligação. Adaptado de BOITEUX; JINKS-ROBERTSON (2013).

5.3. Reparo Recombinacional

5.3.1. Reparação Homóloga (*Homologous Repair – HR*)

A recombinação homóloga é a via mais altamente conservada, sendo o principal mecanismo de reparação legítima de *DSBs* e pontes intercadeias, os tipos de danos no DNA mais prejudiciais, causados por radiação ionizante (IR), agentes químicos, reparação da forquilha de replicação interrompida e na síntese incompleta de telômeros. A HR também é importante para a segregação fiel de cromossomos nos eucariotos durante a meiose. É um processo livre de erros porque utiliza a informação genética de uma fita de DNA homóloga não danificada (cromossomo homólogo ou cromátide-irmã) como substrato para a reparação de quebras duplas, ao contrário da NHEJ, que é uma via alternativa de reparação de quebras duplas propensa a erros (para revisão, ver WATTS; Z., 2016).

A HR atua nas fases S e G2/M do ciclo celular. O mecanismo envolve o reconhecimento e ligação do complexo enzimático MRX (Mre11/Rad50/Xrs2 – em leveduras) nas extremidades das *DSBs*, seguido pela remoção de extremidades 5' nas *DSBs* pelas nucleases, gerando caudas de DNA fita simples (3'-ssDNA). Assim, os complexos Rad51p e Rad52p, junto com uma 3'-ssDNA, invadem o duplex de DNA homólogo, levando a formação de um filamento deslocado (*Displacement Loop – D-loop*) intermediário, que proporciona um substrato para a DNA polimerase sintetizar uma nova fita, utilizando a fita intacta como molde (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; MISTELI; SOUTOGLU, 2009; HANAMSHET; MAZINA; MAZIN, 2016). Depois da formação do *D-loop*, a HR pode prosseguir por dois grandes mecanismos alternativos. No mecanismo conhecido como síntese dependente do anelamento de cadeia (*Synthesis-Dependent Strand Annealing - SDSA*), a *D-loop* se dissocia e a cadeia invasora estendida reanela com a segunda extremidade da *DSB*, formando recombinantes não cruzados. No mecanismo de reparação de quebras duplas no DNA

(*Double-Strand Break Repair*– DSBR), a cadeia deslocada da *D-loop* pode anelar com a segunda extremidade da DSB, levando à formação de *D-loops* duplos, que são convertidos para as junções de Holliday (JH). Essas junções podem mover-se ao longo do DNA e são clivadas por uma resolvase, gerando produtos com ou sem *crossing over* (VASCONCELLOS et al., 2007; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; HANAMSHET; MAZINA; MAZIN, 2016).

Enquanto que em células germinativas o *crossing over* entre cromossomos homólogos é essencial para a correta segregação, nas células somáticas, o *crossing over* pode levar a excessiva perda de heterozigosidade. Rad52p é uma importante proteína de HR que foi inicialmente identificada em *S. cerevisiae*, durante uma triagem (*screening*) de mutantes sensíveis a IR. Outras proteínas de HR —Rad50, Rad51, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59 e Mre11— foram também identificadas como pertencendo ao grupo de epistasia Rad52. Entre todos os membros desse grupo, Rad52p tem efeito mais intenso na HR em *S. cerevisiae*. Além disso, mutantes deficientes em Rad52p são os mais sensíveis a IR entre todos os outros simples mutantes de *S. cerevisiae* (para revisão, ver SYMINGTON, 2002; GREENE, 2016). A Figura 5 mostra o esquema de reparo por HR em *S. cerevisiae*.

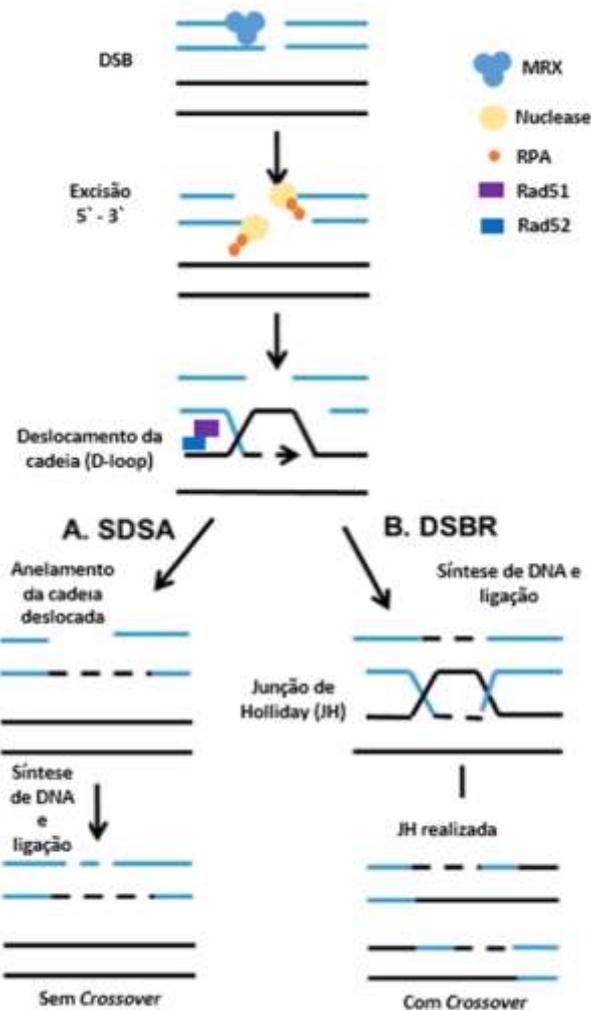


Figura 5: Reparação de DNA pelo sistema HR em *S. cerevisiae*. Diante da DSB, ocorre o reconhecimento e ligação do complexo MRX na extremidade da DSB. Nucleases que formam ssDNAs, cobertas de RPAs, são recrutadas. Rad51p ocupa o lugar das RPAs. Rad51p e Rad52p mediam a formação do D-loop. A D-loop busca sequências homólogas, e uma vez encontradas, o processo de ressecção cessa e Rad51 dissocia-se. A helicase Srs2p media a dissociação da Rad51p e Rad52p, e a DNA polimerase sintetiza as fitas. Assim, a HR pode continuar por dois caminhos: A) SDSA, formando ligações não cruzadas, sem Crossover; ou; B) DSBR, formando ligações cruzadas, com Crossover. Adaptado de HANAMSHET; MAZINA; MAZIN (2016).

5.3.2. Reparação por Recombinação Não-Homóloga (*Non-homologous End-Joining – NHEJ*)

A reparação não-homóloga processa DSBs pela ligação direta das extremidades sem a necessidade de homologia de sequência, e como consequência, é uma via altamente mutagênica. Pode ocorrer em todas as fases do ciclo celular, mas é na fase G1 que essa via de reparo ocorre preferencialmente e apresenta rápida cinética. Por outro lado, a HR ocorre somente nas fases S e G2/M tardia, devido à necessidade de uma sequência homóloga intacta, e apresenta cinética mais lenta, pelo fato de ser dependente de um passo adicional de ressecção de extremidades para reparar DSBs (MISTELI; SOUTOGLU, 2009; KAKAROUGKAS; JEGGO, 2014). Em leveduras, na presença de DSBs, as enzimas Yku70p e Yku80p ligam-se às extremidades do DNA onde está a lesão, recrutando a subunidade catalítica cinase dependente de DNA (complexo DNA-PKcs) e Rad50 ao sítio da lesão, efetuando mudanças na estrutura da cromatina. A ligação das extremidades é feita pela DNA ligase Dnl4 associada com a proteína Lif1 (MLADENOV; ILIAKIS, 2011). Fatores que controlam a ressecção das extremidades são críticos para a escolha entre NHEJ e HR em G2 (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013).

A competição entre o complexo DNA-PKcs e o complexo MRX na detecção e ligação às DSBs inicia uma das vias de reparação recombinacional. Diante de uma DSB, o complexo DNA-PKcs ativa a sinalização e ocorre a reparação por NHEJ em todos os estágios do ciclo celular, enquanto que o reconhecimento de DSB pelo complexo MRX inicia a remoção da extremidade 5' nas DSBs, recrutando as proteínas Sae2, Exo1, Dna2; e a *ssDNA* formada (com extremidade 3') captura proteínas A (RPAs) (revisado em RADHAKRISHNAN; JETTE; LEES-MILLER, 2014; YANG; GUO; XU, 2016). O complexo MRX pode promover a autofosforilação do complexo DNA-PKcs, causando a dissociação do complexo das DSBs, e de uma nuclease associada a HR (como a Exo1p), levando a reparação por HR (ZHOU; PAULL, 2013). Essa competição ocorre durante a fase G2, quando ambas as vias estão presentes. NHEJ domina reparações de DSBs, mesmo na fase G2. A HR está envolvida em 15% a 20% de reparação de DSBs (YANG; GUO; XU, 2016).

A Figura 6 ilustra as vias envolvidas no reparo por NHEJ em *S. cerevisiae*, e as principais proteínas envolvidas na HR e na NHEJ estão mostradas na Tabela 4.

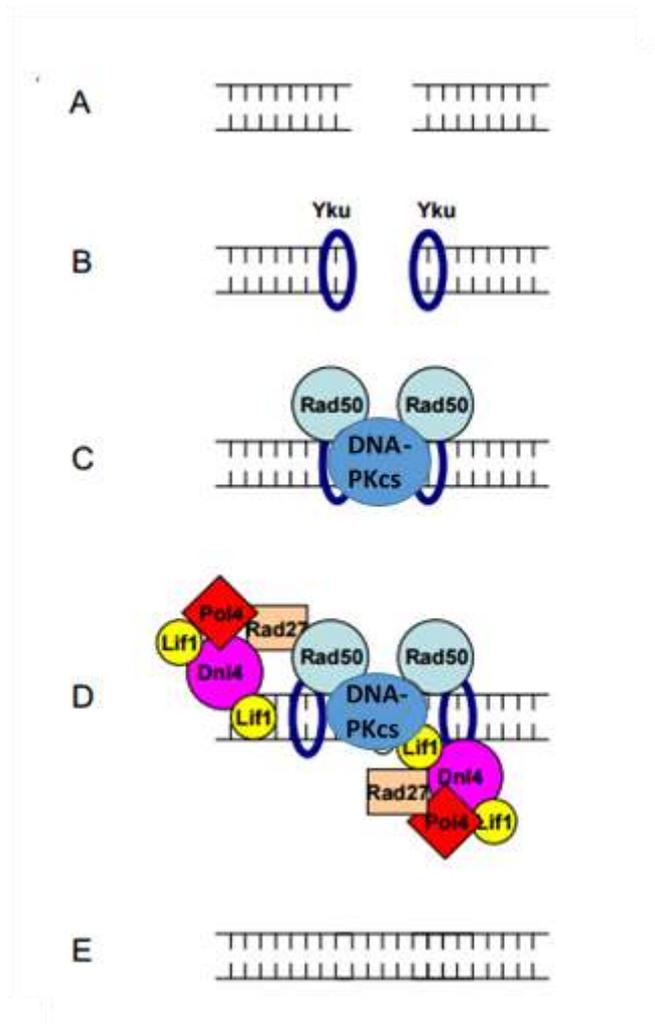


Figura 6: *Reparação de DNA pelo sistema NHEJ em S. cerevisiae.* A) DSB no DNA; B) as enzimas Yku ligam-se às extremidades da lesão; C) o complexo DNA-PKcs e Rad50p associa-se às Yku ligadas ao DNA formando uma espécie de ponte; D e E) a DNA ligase Dnl4p associada com a proteína Lif1 é recrutada ao local da quebra dupla. Ocorre o processamento e preenchimento da lacuna formada pela lesão através da Rad27p e Pol4p. Adaptado de YANG; GUO; XU (2016).

Tabela 4: Principais proteínas de reparo recombinacional em *S. cerevisiae*

| Proteína | Função | Referência |
|----------|---|---|
| Rad52 | Proteína que estimula o anelamento e a troca de cadeias entre as fitas, facilitando a ligação de Rad51p no DNA. Envolvida na reparação de quebras duplas no DNA e ligação homóloga final. | (SYMINGTON, 2002) (SHINOHARA; OGAWA, 1998) |
| Rad50 | Endo e exonuclease, subunidade do complexo | (SYMINGTON, 2002) |

MRX com Mre11p e Xrs2p, que se liga ao DNA. (TKACH et al., 2012)

Envolvida na reparação de quebras duplas e ligação homóloga ou não homóloga final.

5.4. Reparação Pós-Replicativa (*Post Replication Repair – PRR*) e Síntese de Translesão (*Translesion Synthesis – TLS*)

As vias de tolerância ao dano no DNA permitem a aceitação temporal da presença de lesões de DNA no genoma quando existe o risco de morte celular. Os danos ao DNA mais frequentes e deletérios ocorrem durante a replicação. Polimerases eficientes e extremamente fiéis garantem uma rápida e precisa duplicação do DNA durante a fase S do ciclo celular (GAO et al., 2017). No entanto, qualquer distorção na estrutura do DNA pode dificultar o processo e fazer com que a forquilha de replicação pare. Se parada por muito tempo, a forquilha pode entrar em colapso, levando a quebras duplas no DNA, e gerando uma instabilidade genômica. Entretanto, é extremamente importante retomar a replicação mesmo diante de danos persistentes no DNA (para revisão, ver BROOMFIELD; HRYCIW; XIAO, 2001; GAO et al., 2017). A PRR utiliza dois mecanismos principais que permitem a replicação que foi paralisada possa continuar. A primeira é o escape (*by-pass*) indireto usando o mecanismo de prevenção de danos, o segundo é a via de reparação chamada de síntese de translesão. O mecanismo de prevenção de danos ao DNA não é claro. Contudo, o que pode ocorrer é a utilização da cromátide-irmã não danificada como um molde de replicação temporário ou para a recombinação homóloga (JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; DE WIND, 2015).

Quando a forquilha de replicação encontra uma lesão no DNA, as polimerases envolvidas na replicação param e as helicases continuam a desenrolar a dupla hélice. Com o desacoplamento das DNA polimerases e helicases da forquilha parada, longos trechos de *ssDNAs* são formados, e as proteínas A (RPA) presentes ativam o ponto de checagem de replicação. Os trechos de *ssDNA* recobertos por RPAs recrutam Rad18 associado a Rad6 no sítio da lesão (revisado em GAO et al., 2017). A ubiquitinação de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que é uma subunidade da DNA polimerase envolvida na síntese e reparação do DNA, inicia a PRR porque recruta as polimerases da TLS para substituir as polimerases da forquilha de replicação paralisada, iniciando a

reparação (FREUDENTHAL et al., 2010). Embora os trechos de *ssDNA* recobertos com RPAs sejam necessários para o recrutamento de Rad18, muitos outros reguladores têm sido observados para modular esse processo, como por exemplo, a TLS Poln, que facilita a interação de Rad18p pela ligação dessa proteína com seu domínio C-terminal e, ainda, reforça a ubiquitinação de PCNA (DURANDO; TATEISHI; VAZIRI, 2013; GAO et al., 2017).

A TLS é uma via de reparação de tolerância, ou seja, atua em lesões capazes de bloquear a replicação, geralmente consideradas letais para a célula, onde as vias de BER e NER são incapazes de reparar. São danos muito extensos para serem eficientemente removidos. Em virtude disso, a TLS é um mecanismo de tolerância ao dano pós-replicativo. Quando a TLS é acionada, as DNAs polimerases que atuam nesta via inserem um nucleotídeo no lado oposto à base lesada, ultrapassando a lesão, reiniciando a replicação (GAN et al., 2008; DURANDO; TATEISHI; VAZIRI, 2013). Durante a replicação, estas polimerases frequentemente incorporaram incorretamente nucleotídeos nas lesões do DNA e, desta forma, ocorrem mutações quando este está sendo reparado (SALE; LEHMANN; WOODGATE, 2012). Apesar disso, estas mutações podem contribuir com um melhoramento genético, como uma defesa imune mais eficiente. Já as consequências adversas das mutações são tumorigênese ou podem causar distúrbios degenerativos hereditários (para revisão, ver JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; DE WIND, 2015). Em eucariotos, os genes que codificam as polimerases da síntese de translesão foram identificados primeiramente em leveduras, os quais codificam três diferentes polimerases dessa via: *REVersionless1* (*Rev1* – “Reversão menor”), DNA Pol zeta e DNA Pol *eta*. *Rev1p* e Pol *eta* pertencem a família Y das DNA polimerases. Pol zeta pertence à família B das DNA polimerases, composta pela subunidade catalítica *Rev3p*, e a proteína acessória *Rev7*. A DNA polimerase zeta é passível de erro, e a DNA *pol eta* é livre de erros (ROGER et al., 2006; JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; DE WIND, 2015).

A Tabela 5 e a Figura 7 apresentam as principais proteínas envolvidas nos sistemas PRR e TLS em *S. cerevisiae*.

Tabela 5: Principais proteínas do reparo pós replicativo em *S. cerevisiae*

| Proteína | Função | Referência |
|-----------------|--|---|
| Rad6 | Enzima conjugadora de ubiquitina (E2), envolvida na reparação pós-replicativa juntamente com Rad18, regula a poliubiquitinação de K63 em resposta ao estresse oxidativo. | (STOLZ et al., 2013) (SILVA; FINLEY; VOGEL, 2015) |
| Rad18 | Enzima ubiquitina ligase (E3), envolvida na reparação pós replicativa juntamente com Rad6. Liga-se ao DNA e tem atividade de ATPase. Envolvida na SUMOrilação do PCNA. | (PARKER; ULRICH, 2012) |
| Rev1 | Enzima desoxicitidil transferase, envolvida na reparação de sítios abásicos e adutos de guanina na TLS. Forma complexos com a DNA polimerase zeta, Rev3p e Rev7p. <i>REVI</i> codifica uma desoxicitidil transferase, uma DNA polimerase que preferencialmente incorpora um C através de sítios abásicos ou bases danificadas. | (HARACSKA et al., 2001) (TKACH et al., 2012) |
| Rev3 | Subunidade catalítica da DNA pol zeta (ζ). Ultrapassa lesões do tipo dímeros de pirimidina e sítios AP. Repara DSB's. | (MAKAROVA; STODOLA; BURGERS, 2012) (LEE; MYUNG, 2008) |
| Rad30 | Rad30p codifica a DNA polimerase η , Membro da família Y de DNA polimerases envolvidas na TLS durante o reparo pós-replicativo. Rad30p incorpora nucleotídeos em uma ampla gama de lesões no DNA, tais como dímeros, pares de bases danificadas e sítios abásicos que podem fazer com que a forquilha de replicação se paralise. Rad30p é comumente considerada uma polimerase da TLS livre de erros, pois pode inserir corretamente duas A's no sítio da lesão. Rad30p é recrutada na forquilha de replicação após a ubiquitinação de PCNA pelo complexo Rad6p-Rad18p em resposta ao dano do DNA | (JOHNSON; PRAKASH; PRAKASH, 1999); (YUAN et al., 2000); (CHATTERJEE; PABLA; SIEDE, 2013). |

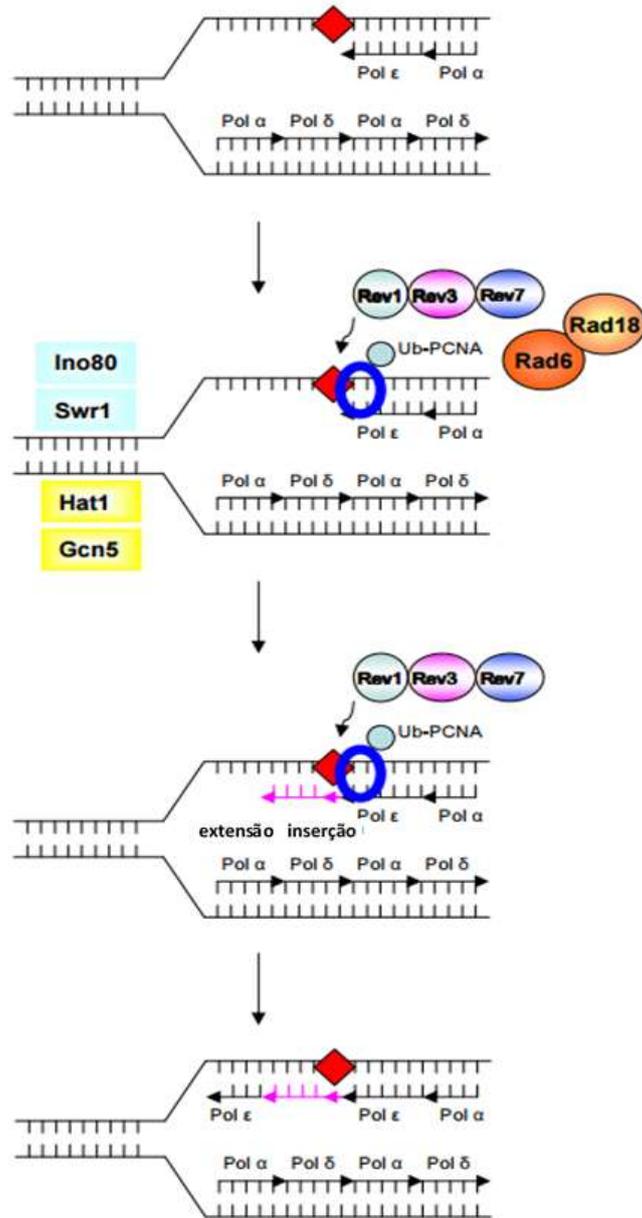


Figura 7: Reparação de DNA pelos sistemas PRR e TLS em *S. cerevisiae*. As polimerases replicativas, Pol δ e Pol ϵ , responsáveis pela replicação do DNA genômico, não são capazes de ultrapassar a lesão (losango vermelho), ocasionando, assim, a parada da replicação. Com a forquilha de replicação paralisada, o complexo Rad6p/Rad18p ubiquitina – PCNA dissocia as polimerases de replicação e recruta polimerases capazes de ultrapassar a lesão: Pol zeta (Rev3-Rev7) associada a Rev1p. A partir desse ponto, modificadores da cromatina (Nhp10p, Ino80p, Swr1p, Hat1p e Gcn5p) podem agir. Pol zeta ou Rev1 insere um nucleotídeo no filamento oposto ao que contém a lesão, e pol zeta realiza a extensão. O complexo envolvendo Rev3p-Rev7p e Rev1p, após ultrapassar a lesão, é dissociado e as polimerases de replicação são reassociadas, dando continuidade a síntese de DNA. Adaptado de GAO et al. (2017)



Objetivos

Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo investigar as atividades biológicas do valproato de sódio e derivados organometálicos $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ e $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ em relação à citotoxicidade, mutagenicidade e reparação de DNA em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do ácido valproico e dos derivados $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{phen}]$ e $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ em linhagens de *S. cerevisiae* em diferentes fases de crescimento pelo teste de sobrevivência quantitativo.
- Estabelecer o potencial mutagênico dos derivados $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{phen}]$ e $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ e do ácido valproico utilizando a linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*.
- Verificar a influência dos derivados $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{phen}]$ e $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ e do ácido valproico sobre as vias de reparação de DNA utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes nas vias de reparação por excisão de bases, excisão de nucleotídeos, recombinação homóloga, recombinação não-homóloga e reparação pós-replicativa.



Capítulo I

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO I

Citotoxicidade, mutagenicidade e vias envolvidas na reparação das lesões no DNA induzidas por complexos organometálicos derivados do ácido valproico em *Saccharomyces cerevisiae*

O capítulo I apresenta um manuscrito, o qual será submetido a revista *Biochemical Pharmacology*, intitulado `Citotoxicidade, mutagenicidade e vias envolvidas na reparação das lesões no DNA induzidas por complexos organometálicos derivados do ácido valproico em *Saccharomyces cerevisiae`.*

Os resultados deste capítulo indicam que o AV e derivados organometálicos causam distintas lesões ao DNA, inferido pelos diferentes mecanismos de reparação verificados com a exposição de linhagens da levedura aos compostos.

INVESTIGATION OF CITOTOXICITY, MUTAGENICITY AND DNA REPAIR PATHWAYS INVOLVED IN REPAIR OF LESIONS INDUCED BY Cu(II) AND Mg(II) COMPLEXES BASED ON VALPROIC ACID WITH 1,10-PHENANTHROLINE IN *Saccharomyces cerevisiae*

Gabriel Berbigier Rodrigues¹, Iuri Marques de Oliveira¹, Miriana Machado¹, Claus Tröger Pich², Mariana Roesch-Ely³, Sidnei Moura⁴, Françoise Dumas⁵, João Antonio Pêgas Henriques^{1,3*}

¹Department of Biophysics and Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Genetic and Environmental toxicology Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Araranguá Campus, Araranguá, SC, Brazil.

³Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

⁴Laboratory of Natural and Synthetics Products, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.

⁵Laboratoire BioCIS, CNRS UMR 8076, IPSIT and LabEx LERMIT, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

*Corresponding author

Prof. Dr. Joao Antonio Pêgas Henriques

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS / Centro de Biotecnologia

Av. Bento Goncalves, 9500, Prédio 43421, Bairro Agronomia, CEP: 91501-970

Caixa Postal 15005 Porto Alegre/RS Brazil

Telephone: +55 (51) 3308 7600

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

The valproic acid (VA) has been largely used as anti-epilepsy drug and, recently, as a putative drug in cancer therapy. The effects that lead to this use are probably epigenetic and include the ability to inhibit histone deacetylases leading to induction of oxidative stress, DNA damage, apoptosis and inhibition of DNA repair pathways. Molecules that induce damage DNA and/or DNA repair inhibition, such as VA, are good candidates for development of new anticancer agents. However, VA treatment has adverse affects. In this sense, organometallic complexes may be more effective than the precursor organic molecules. We therefore analyzed cytotoxicity to sodium valproate (NaValp), Cu(II) and Mg complexes of VA with 1,10-phenanthroline (Phen) - $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ - in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, proficient or defective for base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), translesion synthesis (TLS), post-replication repair (PRR), homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ). The results indicated that organometallic complexes have higher cytotoxicity than NaValp: $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}] > [\text{Cu}_2(\text{Valp})_4] = [\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}] > \text{NaValp}$. Treatment of the XV185-14c strain with NaValp did not induce mutagenicity, but organometallic complexes showed induction of base pair substitutions. The data indicated that deficient in BER (Ogg1p), NER (complex Rad1p-Rad10p) or TLS (Rev1p, Rev3p and Rad30p) proteins are associated with increased sensitivity to NaValp. The results also revealed that BER mutants (*ogg1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ* and *ntg2Δ*) showed sensitivity to $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. However, the presence of BER endonucleases results higher sensitivity to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ exposure than strains deficient in BER proteins. DNA damage induced by organometallic complexes can be repaired by NER (Rad1p and Rad10p), TLS (Rev1p, Rev3p and Rad30p), PRR (Rad6 and Rad18p), HR (Rad52p) and NHEJ (Rad50p) proteins. Therefore, our study reveals that organometallic complexes have an enhanced cytotoxicity when compared to the NaValp and induce distinct DNA lesions, indicating a potential application as cytotoxic agents.

Key words: Valproic acid, organometallic complexes, copper, magnesium, DNA repair, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUCTION

The Valproic Acid (VA, 2-propylpentanoic acid, Fig. 1A) is still the drug most used for the treatment and prevention of seizures, schizophrenia, mood stabilizer in bipolar disorder and migraine headaches therapy [1][2], has also been shown to possess histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity, along with anti-metastatic and anticancer activities [3]. The HDAC inhibitory effect could alter expression of many genes [4] and influence several important cellular processes such as cell cycle control, differentiation, DNA repair, apoptosis and senescence [5][6]. Consequently, VA is currently undergoing clinical trials as an anticancer agent either as a single agent, or as part of different combination regimens [7]. However, this drug can cause a number of adverse effects, the main ones are directly related to chronic use, such as weight gain, hepatotoxicity, hyperammonemia, thrombocytopenia, pancreatitis and teratogenicity [8]. Therefore, VA analogs or derivatives have been developed in an effort to overcome undesired effects [9]. The VA, due its chemical structure, makes this molecule more promising for the development of new derivative drugs, especially organometallic compounds, and in view of the side effects of VA, derivatives of this molecule lead to an increase in the pharmacological effect, more efficient therapies and with less adverse reactions [6]. In this sense, platinum(IV) prodrug diaminedichlorodihydroxyplatinum conjugated with VA was 50–100 times more cytotoxic than original compound against various human carcinoma cell lines and showed *in vivo* inhibitory effect on lung carcinoma from human(A549)-xenograft tumor growth with low systemic toxicity [10]. Zn(II) complex containing Phen and 2,2'- bipyridine with VA showed higher cytotoxicity in relation to VA in *Artemia salina* [11].

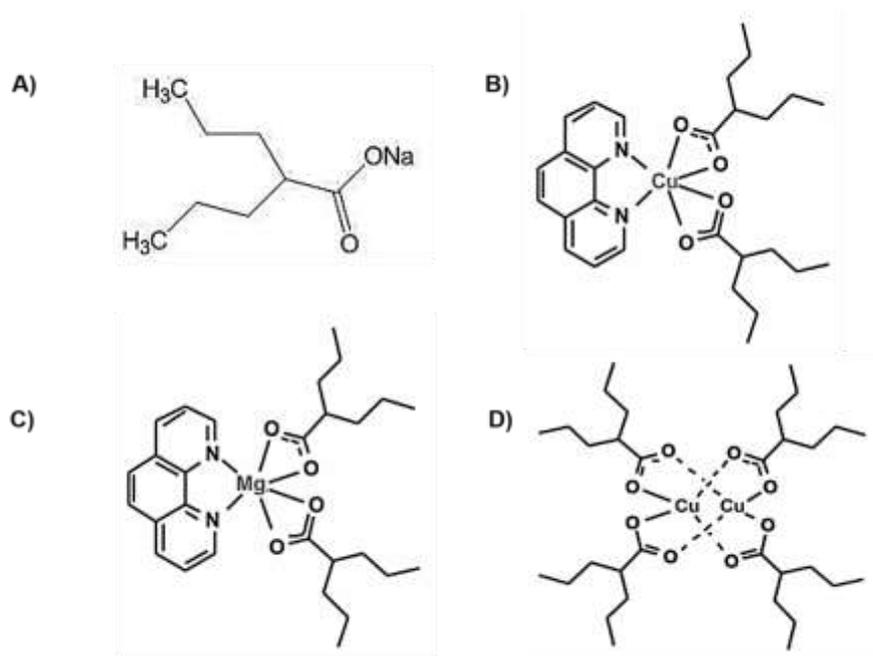


Fig. 1. Chemical structure of (A) NaValp, (B) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, (C) $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and (D) $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$.

The magnesium and copper ions produce stable complexes with valproate ions that had much higher therapeutic effects than the parent compound [12]. In this sense, Raghunathan et al. (2017) tested magnesium valproate (MgV) in order to control cardiac hypertrophy and showed that this compound is a class I HDAC inhibitor five times more potent than the trichostatin A [13]. Ternary copper(II) complex of VA (Valp) and 1,10-phenanthroline (Phen) ($[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, Figure 1B) was shown to increase three thousand times the anticonvulsant activity of VA in mouse models of epilepsy [14]. In addition, it exhibits discrete anti-inflammatory activity *in vivo* [15]. On the other hand, organic molecules with metal centers may enter easier in the cell and interact with the DNA, running as metallonucleases [16]. Nitrogen donor such as Phen have been used as ligands in several metal complexes due to their ability to interact with DNA as groove binders or even as intercalators and frequently inducing DNA cleavage [17]. Complexation with some divalent transition metals enhances these biological activities [16][17]. Thus, ternary complexes of Cu(II) with Phen have been synthesized and their cytotoxic properties were evaluated. Among them, the most potent complex proved to be bis(diisopropylsalicylato)(2,9-dimethylphenanthroline)copper(II) which exhibits cytotoxicity comparable with cisplatin, an anticancer drug [18]. Furthermore,

the cytotoxic potential of transition-metal complexes emerges as a field of great interest to improve the development of new anticancer therapeutic approaches [19].

Molecules which induce DNA damage and/or induce inhibition of DNA repair pathways, would make them better candidates for development of anticancer agents[20][21][22]. VA can silence DNA repair pathways, inactivate DNA repair proteins, induce reactive oxygen species (ROS) and DNA double strand breaks (DSBs) [23]. Makita et.al. showed that VA has the potential to synergistically inhibit DSBs repair pathways by acetylating p53 in the DSBs signaling cascade and Ku70 in non-homologous end-joining (NHEJ), as well as suppressing Rad51 expression levels in homologous recombination (HR), inhibiting both HR and NHEJ in the DSB repair process in esophageal squamous carcinoma cells [24]. GOLLA et al. (2016) showed that VA induces changes in the expression of genes in yeast involved in DNA repair pathways: base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) and NHEJ [25]. In this sense, since it is not clear how the VA and their three related complexes studied in this work, $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ (Fig. 1B-D), influence DNA damage and its repair. Thus, we chose the unicellular eukaryotic organism *Saccharomyces cerevisiae* in order to predict toxicity in humans and better understand the molecular mechanism of action of these drugs. The choice was based on the fact that offers a robust model organism to unravel the conserved molecular targets and mode of action of bioactive molecules [26]. Moreover, yeast cells can be easily genetically manipulated and mutants for specific biochemical pathways can be generated rapidly[27] [28]. In this work we will present the VA and derivatives $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ sensitivity of single, double, triple, and quadruple mutants that are blocked in different mechanisms of DNA repair pathways. Moreover, induced mutagenesis was assayed in haploid *S. cerevisiae* strain XV185-14C, where two types of mutations (locus-specific, reversion of the *lys1-1* ochre or *his1-7* missense allele) and frameshift (*hom3-10*) can be detected. The understanding of cytotoxicity, mutagenicity and repair of DNA lesions induced by a new drug should facilitate the identification of molecular markers for prediction of toxicity and help to elucidate its mechanism of action to a development of putative anticancer drugs and safety of possible future pharmacological applications. In addition, the effects of VA in DNA damage and repair are unclear.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Sodium valproate (NaValp, Fig. 1A) 98% was purchased from AK Scientific (Union City, CA, USA). $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ (Fig. 1D and 1B, respectively) was provided by Dr Sidnei Moura, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil. The compound $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ (Fig. 1C) was provided by Dr Françoise Dumas, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry Cedex, France. Reagents for culture medium (yeast extract, bacto-peptone, bacto-agar and glucose) were acquired from Merck. All other chemicals and solvents used were of analytical reagent grade and produced from commercial sources.

2.2. Yeast strains and media

The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Media, solutions and buffers were prepared as previously described by Burke et al. [29]. Complete medium (YPD) containing 0.5% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose was used for routine growth. Minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and 2% bacto-agar. Synthetic complete (SC) medium consisted of MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, and 2 mg tryptophan per 100 mL. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar. For mutagenesis in the XV185-14c strain, we used drop-out medium lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (SC-hom).

Table 1:

| Strains | Relevant genotypes | DNA repair pathway affected | Source |
|---------------------------------|---|-----------------------------|-----------|
| BY4741 (WT) | <i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> | - | Euroscarf |
| <i>apn1Δ</i> | BY4741; with <i>apn1::kanMX4</i> | BER | Euroscarf |
| <i>mag1Δ</i> | BY4741; with <i>mag1::kanMX4</i> | BER | Euroscarf |
| <i>rad27Δ</i> | BY4741; with <i>rad27::kanMX4</i> | BER | Euroscarf |
| <i>rad1Δ</i> | BY4741; with <i>rad1::kanMX4</i> | NER | Euroscarf |
| <i>rad10Δ</i> | BY4741; with <i>rad10::kanMX4</i> | NER | Euroscarf |
| <i>rad6Δ</i> | BY4741; with <i>rad6::kanMX4</i> | PRR | Euroscarf |

| | | | |
|---------------------------------|---|---------|-----------------|
| <i>rad18Δ</i> | BY4741; with <i>rad18::kanMX4</i> | PRR | Euroscarf |
| <i>rad4Δ</i> | BY4741; with <i>rad4::kanMX4</i> | NER | Euroscarf |
| <i>rad14Δ</i> | BY4741; with <i>rad14::kanMX4</i> | NER | Euroscarf |
| <i>rad50Δ</i> | BY4741; with <i>rad50::kanMX4</i> | NHEJ | Euroscarf |
| <i>rad52Δ</i> | BY4741; with <i>rad52::kanMX4</i> | HR | Euroscarf |
| <i>rev1Δ</i> | BY4741; with <i>rev1::kanMX4</i> | TLS | Euroscarf |
| <i>rev3Δ</i> | BY4741; with <i>rev3::kanMX4</i> | TLS | Euroscarf |
| <i>rad30Δ</i> | BY4741; with <i>rad30::kanMX4</i> | TLS | Euroscarf |
| <i>ogg1Δ</i> | BY4741; with <i>ogg1::kanMX4</i> | BER | Euroscarf |
| <i>apn2Δ</i> | BY4741; with <i>apn2::kanMX</i> | BER | Euroscarf |
| <i>apn1Δ apn2Δ</i> | BY4741, with <i>apn1::URA</i> <i>apn2::kanMX</i> | BER | R Medina-Silva |
| SJR751 (WT) | <i>MATα</i> ; <i>ade2-101_{oc}</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>ura3ΔNco</i> ; <i>lys2ΔBgl</i> ; <i>leu2-R</i> | - | RL Swanson* |
| <i>ntg1Δ</i> | SJR751; with <i>ntg1::LEU2</i> | BER | RL Swanson* |
| <i>ntg2Δ</i> | SJR751; with <i>ntg2::hisG</i> | BER | RL Swanson* |
| <i>ntg1Δ ntg2Δ</i> | SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i> | BER | RL Swanson* |
| <i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ</i> | SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i> <i>apn1::HIS3</i> | BER | RL Swanson* |
| <i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i> | SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i> <i>apn1::HIS3 rad1::hisG</i> | BER/NER | RL Swanson* |
| <i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i> | SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i> <i>apn1::HIS3 rad52::URA3</i> | BER/HR | RL Swanson* |
| XV185-14C | <i>MATα</i> ; <i>ade2-2</i> ; <i>arg4-17</i> ; <i>his1-7</i> ; <i>lys1-1</i> ; <i>trp5-48</i> ; <i>hom3-10</i> | - | R.C Von Borstel |

* Swanson *et al.* (1999)

2.3. Yeast growth conditions

Exponential phase (Log) cultures were obtained by inoculation of 5×10^5 cells/mL of YPD culture in stationary phase into 5 mL of fresh YPD medium. After 24 h incubation, at 30 °C with aeration, the cultures contained $1-2 \times 10^7$ cells/mL with 20-30% budding cells. The number of cells was determined by counting in Neubauer chamber.

2.4. Cytotoxicity in yeast strains proficient and deficient in DNA repair.

The survival after treatment with VA and related complexes was measured by preparing cell suspensions containing 5×10^5 Log cells/mL and incubated in culture medium at 30 °C for 24 h with agitation. After incubation, samples were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, 0.067 M, pH 7.0, plated onto YPD agar, and incubated at 30 °C for 2-3 days. To survival assay with BY4741 wide type, the higher

concentrations were based on their maximum solubility. To survival assay with yeast strains proficient and deficient in DNA repair, the NaValp concentrations employed were 13, 26 and 52 mM; [Cu₂(Valp)₄] or [Cu(Valp)₂Phen] concentrations were 0.5, 1.0 and 2.0 mM, and [Mg(Valp)₂Phen] concentrations were 0.1, 0.2 and 0.3 mM. All assays were performed at least twice with each dose in triplicate.

2.5. Detection of NaValp and complexes -induced reverse and frameshift mutation in *S. cerevisiae*.

Mutagenesis was measured in the *S. cerevisiae* XV185-14c strain. Suspensions of 2×10^8 cells/mL in exponential growth phase were incubated in phosphate-buffered saline solution (PBS; Na₂HPO₄ and KCl; 20 mM; pH 7.4) in fresh media for mutagenic evaluation under growth conditions, with different concentrations of NaValp, [Cu₂(Valp)₄], [Cu(Valp)₂Phen] or [Mg(Valp)₂Phen]. The highest VA or organometallic complexes concentrations used, providing about 50% survival and was determined in the previous cytotoxicity test (Fig. 2). Cell survival was determined in SC medium (3-5 days of growth at 30°C), and mutation induction (LYS, HIS, or HOM revertants) was assessed in the appropriate omission media (5-7 days, 30°C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutation at the locus itself, *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele, which can be reverted either by locus-specific mutation or forward mutation in a suppressor gene. True reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus were differentiated according to von Borstel et al. [29]. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [30]. Assays were repeated at least three times, and plating was done in triplicate for each dose.

3. RESULTS

3.1. NaValp and organometallic complexes cytotoxicity and mutagenicity in strains of the yeast *S. cerevisiae*

As shown in Figure 2A, NaValp was cytotoxic at a concentration range of 25 – 150 mM with 50% of survival at the 51.58 mM. Among the organometallic compounds,

similar cytotoxic was observed for $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ with 50% of survival at the concentrations 2.01 mM (Fig. 2B) and 1.85 mM (Fig. 2C), respectively. In relation to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complex was observed 50% reduction in yeast survival at the 0.35 mM (Fig. 2D). The $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complexes showed cytotoxicity at least ~25 times higher than the NaValp. However, the $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ compound was at least ~140 times more cytotoxic than NaValp. Therefore, organometallic complexes were more cytotoxic than the NaValp to yeast cells.

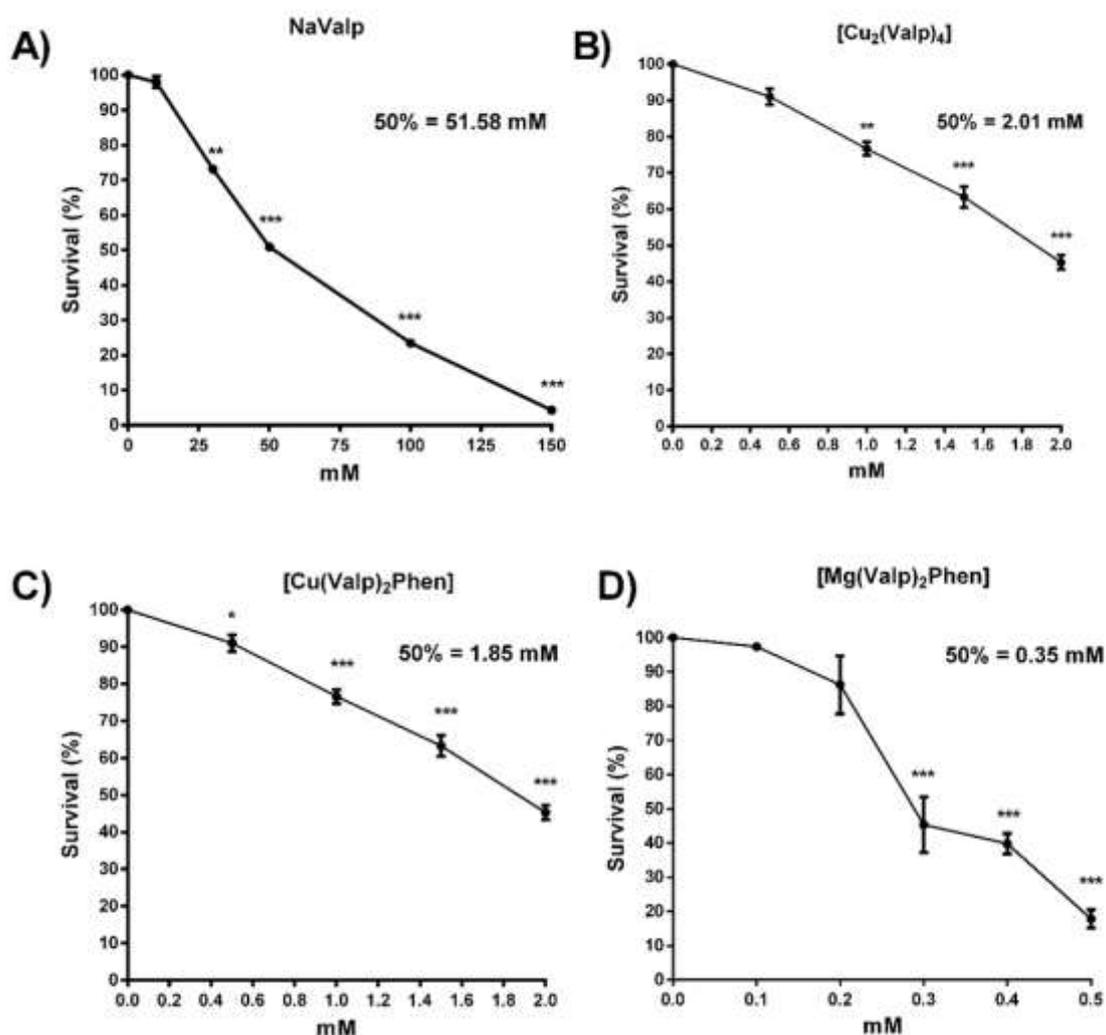


Fig. 2. Sensitivity of WT yeast strain (BY4741) in growth conditions to VA and organometallic complexes exposure: (A) NaValp, (B) $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, (C) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and (D) $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. Cells were treated for 24 h at 30°C. The data represent an average of three independent experiments. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

Table 2. Induction of point mutation (*his1-7*) ochre allele (*lys1-1*) and frameshift (*hom3-10*) mutation in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after VA or organometallic complexes treatment during logarithmic growth phase

| Agent | Treatment | Survival (%) | HIS/10 ⁷ survivors | LIS/10 ⁷ survivors | HOM/10 ⁷ survivors |
|--|-----------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| NC | 0 | 100 (335) | 5.11±0.93 (34) | 4.32±0.68 (29) | 2.94±0.69 (19) |
| PC (4NQO) | 0.5 µg/mL | 56.32±5.56 (188) | 68.18±12.49 (252)*** | 46.63±10.74 (175)*** | 27.03±7.54 (101)*** |
| NaValp | 12.9 mM | 94.87±4.34 (303) | 5.74±0.34 (35) | 4.20±0.35 (25) | 2.68±0.15 (16) |
| | 25.8 mM | 82.16±9.93 (262) | 6.48±0.41 (34) | 4.47±0.31 (23) | 2.80±0.77 (15) |
| | 51.6 mM | 53.52±8.60 (172)** | 6.43±0.88 (22) | 5.93±0.43 (20) | 3.98±0.56 (14) |
| [Cu ₂ (Valp ₄)] | 0.5 mM | 93.27±4.31 (362) | 4.52±0.56 (33) | 4.89±0.86 (35) | 2.63±0.34 (19) |
| | 1.0 mM | 84.76±2.19 (329) | 6.61±1.13 (44) | 7.09±1.11 (47) | 2.85±0.77 (19) |
| | 2.0 mM | 56.91±3.64 (221)** | 12.27±2.36 (54)** | 12.15±1.81 (54)** | 3.73±0.58 (17) |
| [Cu(Valp ₂)Phen] | 0.45 mM | 92.83±4.25 (274) | 7.51±2.30 (40) | 6.06±1.49 (32) | 3.75±0.89 (20) |
| | 0.90 mM | 84.28±2.64 (249) | 10.56±3.0 (51)* | 8.78±1.57 (43)* | 3.96±0.68 (19) |
| | 1.85 mM | 58.53±2.14 (173)*** | 17.51±3.07 (59)*** | 14.22±2.10 (48)*** | 4.08±0.70 (14) |
| [Mg(Valp ₂)Phen] | 0.07 mM | 92.75±1.90 (311) | 5.80±0.66 (36) | 5.70±1.14 (35) | 2.88±0.58 (18) |
| | 0.15 mM | 88.72±1.90 (297) | 8.22±2.10 (47)* | 7.37±1.10 (43)* | 3.31±0.70 (19) |
| | 0.30 mM | 55.10±3.79 (185)*** | 17.60±3.01 (64)*** | 14.68±2.36 (53)*** | 3.91±0.75 (14) |

^a Locus-specific revertants; ^b Locus non-specific revertants (forward mutation); ^c Negative control; ^d Positive control: 4-NQO treatment at 0.5 µg/mL; ^e Numbers of colonies; ^f Mean and standard deviation from three independent experiments; *Data significant in relation to the negative control group at $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ / One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

With respect to mutagenicity, we did not observe any mutagenic effect for NaValp in *S. cerevisiae* XV185-14c haploid strain (Table 2). However, Table 2 indicates that the mutation frequencies at the *his1-7* and *lys1-1* loci were significant at higher concentrations of organometallic complexes. Moreover, mutation frequency at the *hom3-10* locus was similar to negative control at all doses after treatment with organometallic complexes (Table 2).

3.2. Sensitivity of DNA repair-deficient yeast strains for NaValp and organometallic complexes

In order to evaluate the interaction of DNA repair pathways in response to VA or organometallic complexes -induced DNA damage, we also performed survival assays to compare the sensitivities of single, double, triple, and quadruple mutants defective in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ), post-replication repair (PRR) and translesion synthesis (TLS). Among the BER-deficient strains, the single mutant for DNA N-glycosylase *ogg1Δ* displayed increased cytotoxicity to NaValp exposure when compared to the isogenic BY4741 WT strain (Fig. 3A). The strains defective for Apn1p, Apn2p, Rad27p, Ntg1p, Ntg2p and Mag1p have similar WT-sensitivity to the same NaValp treatment (Fig. 3A). The single- *ogg1Δ*, *rad27Δ*, *apn1Δ*, double- *apn1Δ apn2Δ*, *ntg1Δ*, *ntg2Δ* and double *ntg1Δ ntg2Δ* mutants, while *mag1Δ* and *apn2Δ* strains have similar WT-sensitivity to [Cu₂(Valp)₄] and [Cu(Valp)₂Phen] treatment (Fig. 3B and 3C). In contrast, the strains defective for BER proteins, *mag1Δ*, *ogg1Δ*, *rad27Δ*, *apn1Δ*, *apn2Δ*, double- *apn1Δ apn2Δ*, *ntg1Δ*, *ntg2Δ* and double *ntg1Δ ntg2Δ* mutants, showed less sensitivity than WT strain for [Mg(Valp)₂Phen] exposure (Fig. 3D).

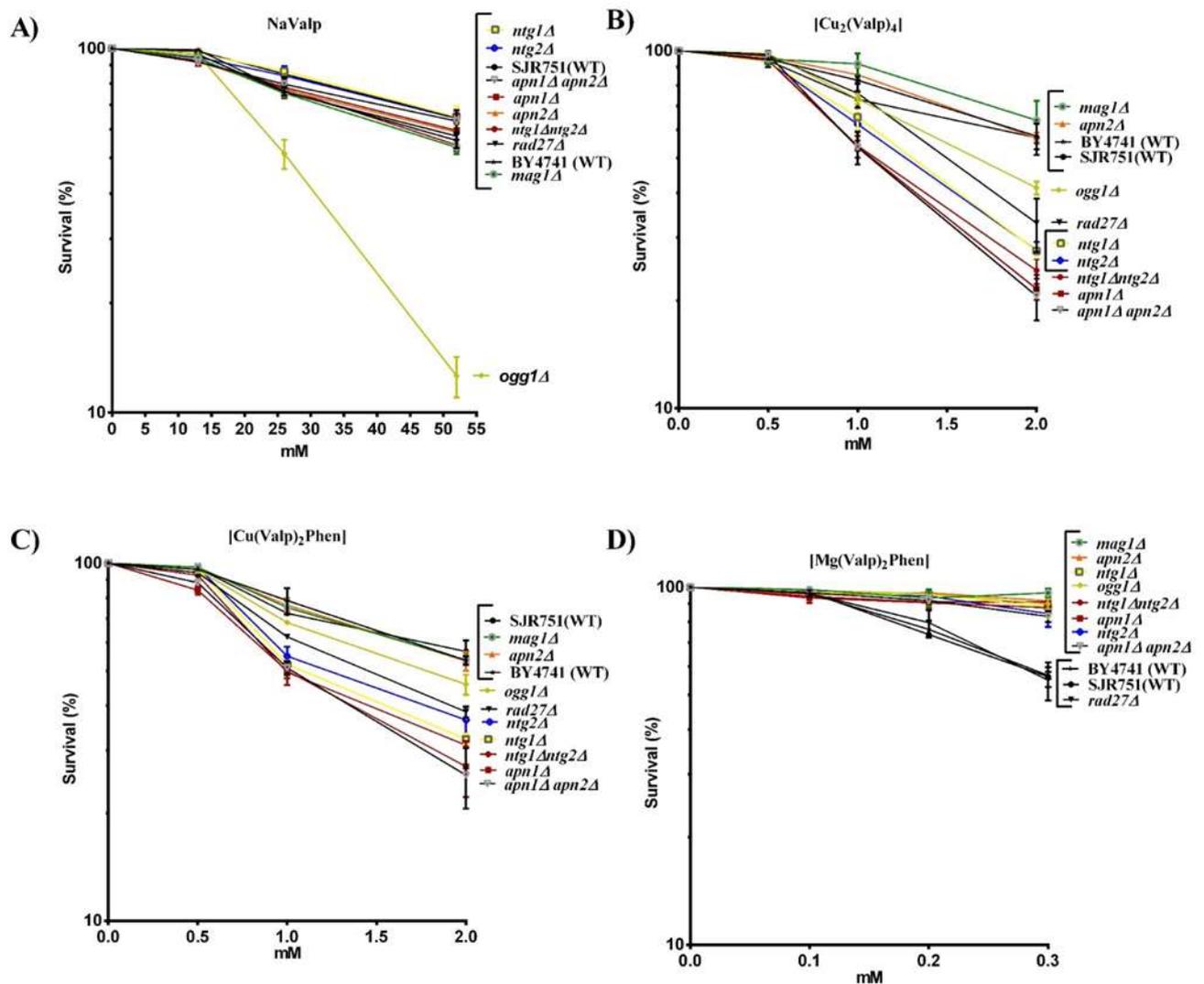


Fig. 3. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in BER proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) $[Cu_2(Valp)_4]$, (C) $[Cu(Valp)_2Phen]$ and (D) $[Mg(Valp)_2Phen]$. The survival of parental strains (BY4742 and SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ogg1, Ntg1, Ntg2, Rad27 and Mag1. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

The *rad1Δ* and *rad10Δ* strains, which lack the 5'- and 3'- endonucleases of NER [31], displayed an moderate sensitivity to NaValp and organometallic complexes (Fig. 4A-D). In contrast, mutants *rad4Δ* and *rad14Δ* (proteins that recognizes and binds damaged DNA during NER) [32], had the same sensitivity as the WT after exposure to VA, $[Cu_2(Valp)_4]$ or $[Cu(Valp)_2Phen]$ (Fig. 4A-C). The strains defective for NER enzymes (Rad1p, Rad10p, Rad4p and Rad14p) showed higher sensitivity when compared to the WT strain for $[Mg(Valp)_2Phen]$ treatment (Fig. 4D).

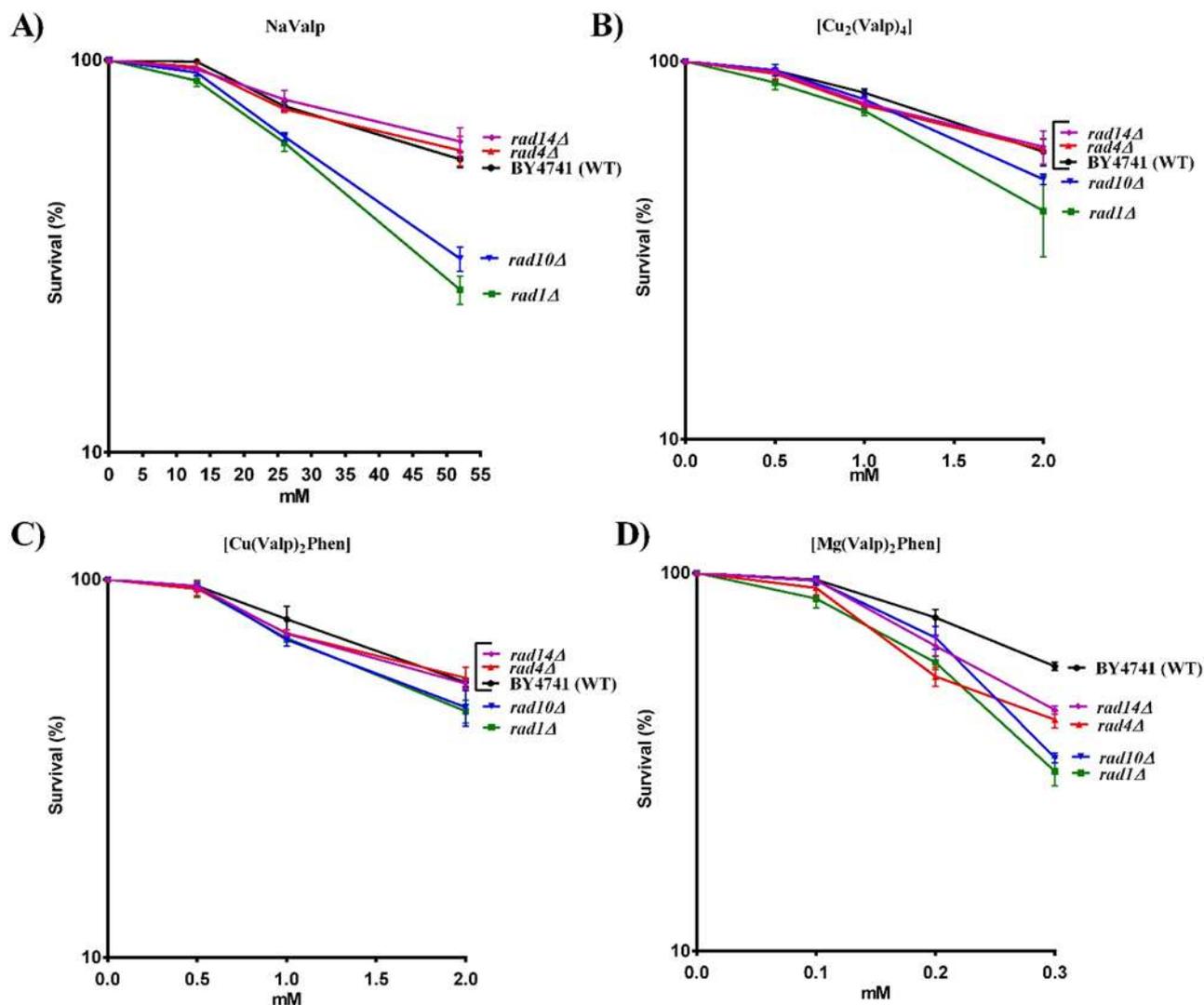


Fig. 4. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in NER proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, (C) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and (D) $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the NER proteins Rad1, Rad10, Rad4 and Rad14. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

The *rev3Δ*, *rev1Δ* and *rad30Δ* strains deficient in TLS proteins showed higher sensitivity to NaValp exposure in relation to WT (Fig. 5A). In contrast, the strains *rev1Δ* and *rev3Δ* showed less sensitivity when compared to the WT strain for organometallic complexes (Fig. 5B-D). However, *rad30Δ* strain was weakly more sensitive than WT to organometallic complexes (Fig. 5B-D). The PPR deficient strains *rad6Δ* and *rad18Δ*

showed same sensitivity when compared to the WT after NaValp exposure (Fig. 5A), but have higher sensitivity than WT to organometallic complexes exposure (Fig. 5B-D).

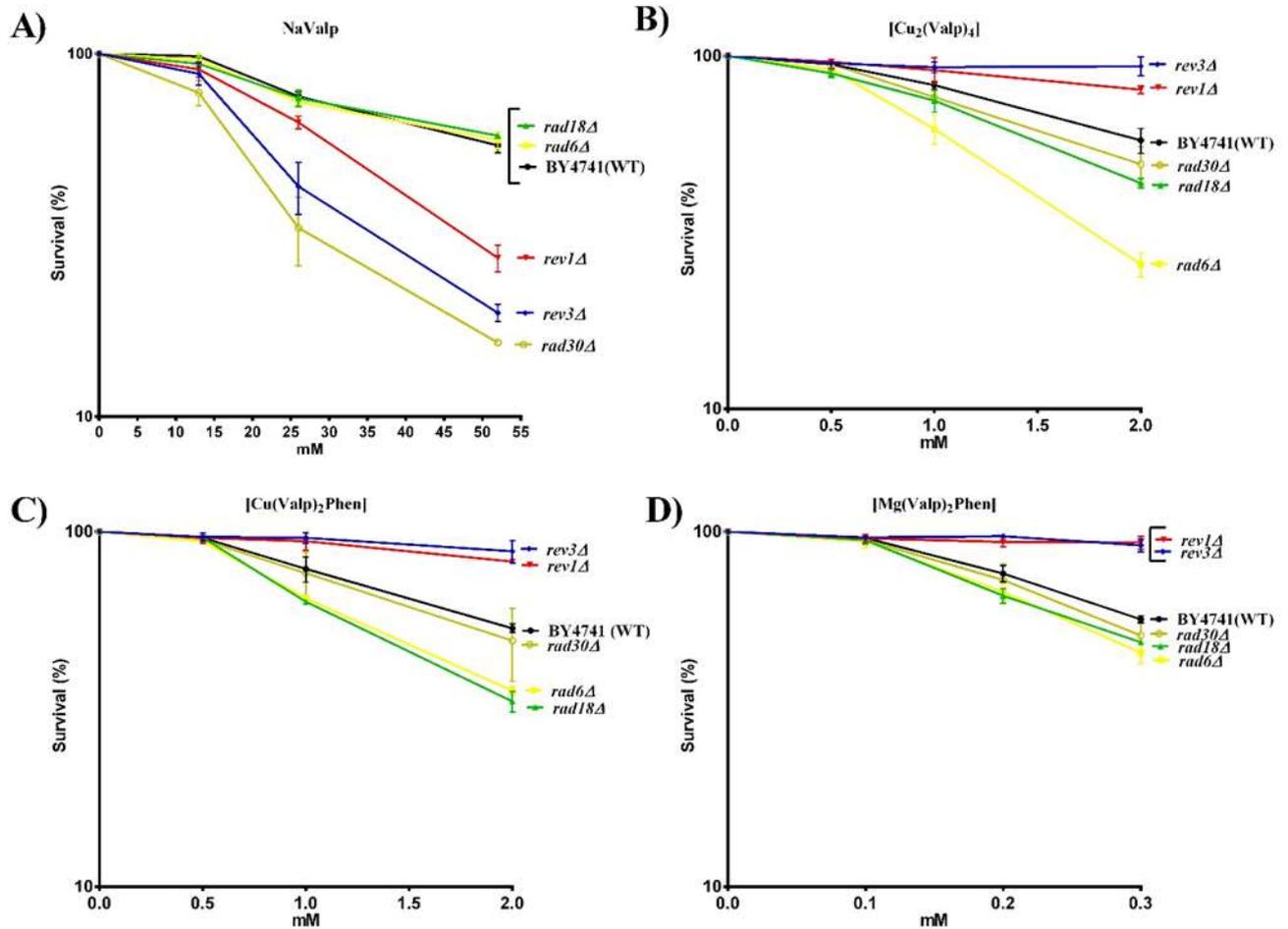


Fig. 5. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in TLS or PRR proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu₂(Valp)₄], (C) [Cu(Valp)₂Phen] and (D) [Mg(Valp)₂Phen]. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the TLS proteins Rev1, Rev3 and Rad30 or PRR proteins Rad6 and Rad18. Data are expressed as mean ± SD, n=4.

The mutant strains *rad52Δ* (HR pathway) and *rad50Δ* (subunit of the MRX complex involved in both HR and NHEJ) showed the same sensitivity as that observed for WT cells to NaValp exposure (Fig. 6A). However, the recombination-deficient *rad52Δ* and *rad50Δ* showed the higher sensitivity in relation to isogenic WT strain to organometallic complexes (Fig. 6B-D).

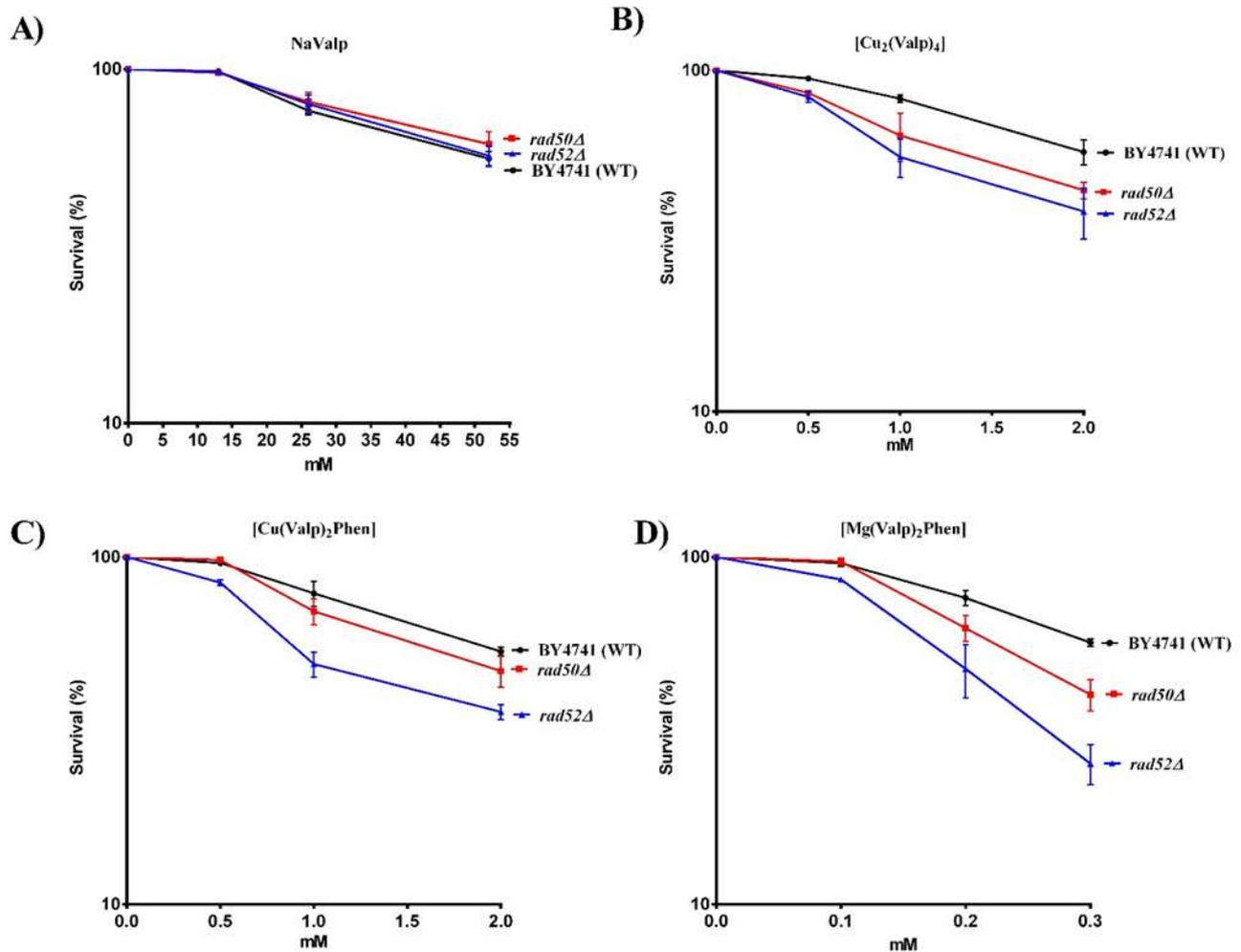


Fig. 6. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in HR or NHEJ proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu₂(Valp)₄], (C) [Cu(Valp)₂Phen] and (D) [Mg(Valp)₂Phen]. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the HR protein Rad52 or NHEJ protein Rad50. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

In order to evaluate the interaction of DNA repair pathways in response to NaValp or organometallic complexes -induced DNA damage, we also performed survival assays to compare the sensitivities of single, double, triple and quadruple mutants defective in BER, NER and HR. The quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* showed the same sensitivity to NaValp as the *rad1Δ* single mutant (Fig. 7A). However, the single *ntg1Δntg2Δapn1Δ* and quadruple *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* mutants showed the same sensitivity as the WT (Fig. 7A).

The quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* was more sensitive to $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ than triple *ntg1Δntg2Δapn1Δ* mutant (Fig. 7B and 7C). It is important to note that the triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* was more sensitive than the single mutants to copper complexes treatment. The *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutant showed less sensitivity than WT to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ treatment (Fig. 7D). Moreover, the *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* quadruple mutants displayed less sensitivity than *rad52Δ* (Fig. 6D) and *rad1Δ* (Fig. 4D) single mutants, respectively, to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ exposure (Fig. 7D).

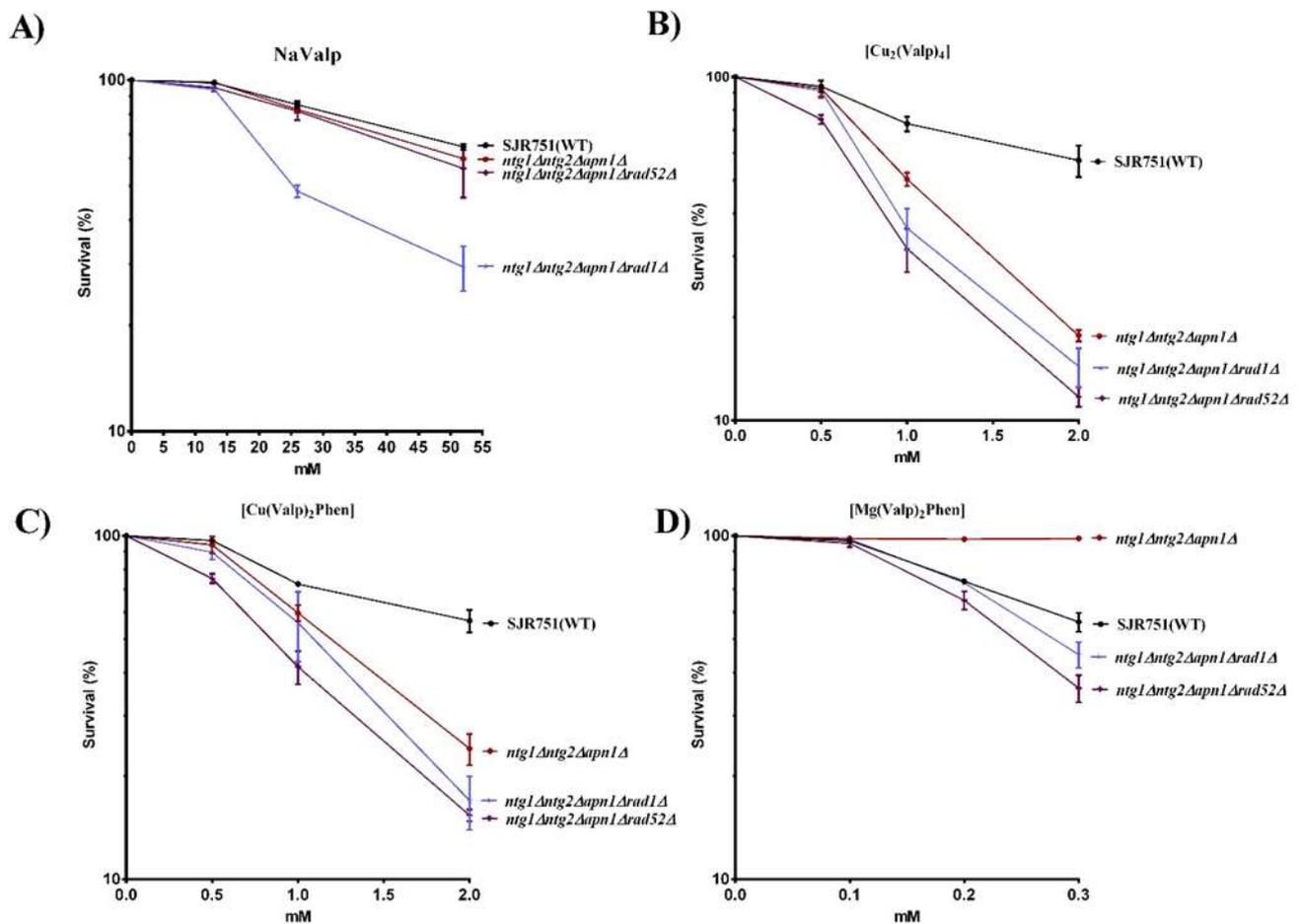


Fig. 7. Survival of *S. cerevisiae* quadruple mutant strains deficient in BER, HR and NER after treatment with A) NaValp, (B) $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$, (C) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and (D) $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. The survival of the parental strain (SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2, the NER protein Rad1 and the HR protein Rad52. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

4. DISCUSSION

In this study, we presented a new group of copper (II) and magnesium complexes with ligands containing VA. Experimental data from our laboratory shows that $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complexes can interact with DNA promoting its cleavage in vitro [55] indicating a potential role as chemotherapeutic agents. Thus, in order to elucidate the biological properties of NaValp and organometallic complexes, we evaluated the response of strains proficient or defective in DNA repair as well as the mutagenic properties of these components using the yeast *S. cerevisiae* as a model organism.

All experiments were carried in fresh synthetic media under growth conditions, with different concentrations of NaValp or organometallic compounds for 24 h. Interestingly, the yeast cells did not displayed sensitivity to the compounds in stationary or exponential phase of growth incubated in PBS under non-growth conditions (data not show). In agreement, Mutoh et al. [33] showed that the sensitivity to VA was strongly dependent of growth phase in *Schizosaccharomyces pombe*. In this sense, NaValp was cytotoxic to BY4741 strain at a concentration range of 25 – 150 mM (Fig. 2A). In fact, Mitsui et al. [34] showed the *S. cerevisiae* growth inhibition in a dose-dependent manner with complete inhibition attained at 100 mM. The organometallic complexes also showed cytotoxic effects in the majority of the concentrations used in survival assay after 24 h of exposure (Fig. 2B-D). Importantly, the organometallic complexes were more cytotoxic than the NaValp, the prototype molecule to yeast cells, in the following increase cytotoxicity order: $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}] > [\text{Cu}_2(\text{Valp})_4] = [\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}] > \text{NaValp}$. In this context, several copper complexes have strong cytotoxic effects in different cell types [35][36]. The NaValp and organometallic complexes also showed cytotoxic effects in the XV185-14c strain, but NaValp did not induce mutagenesis, and the organometallic complexes only induced mutagenesis in the *his1-7* and *lys1-1* loci at the highest concentration (Table 2).

The cellular effects of VA appear to be very complex, but in part linked to its ability to disturb cellular redox homeostasis [37]. Really, Mitsui et al. found that ROS accumulated in yeast cells treated with 25 mM VA after 20 h of incubation [34]. Genomic DNA is a target of oxidative damage and thus results in DNA oxidative lesions, such as 7,8-dihydro-8-oxoguanine (also known as 8-oxoguanine; 8-oxoG) [38]. In this sense, the results of survival assays demonstrated that NaValp leads to

pronounced sensitivity of strain deficient to BER protein Ogg1 (Fig. 3A). Ogg1p is a glycosylase with associated lyase activity that excises 8-oxoG and oxidized formamidopyrimidines [38]. Interestingly, there is an interaction between BER and NER with respect to DNA damage processing, such as during the repair of thymine glycol and 8-oxoG oxidative lesions [38]. In this sense, the Rad1p-Rad10 complex is important for removing 3' dirty ends generated during BER [38]. In fact, our results indicate that the NER-deficient strains *rad1Δ* and *rad10Δ* have sensitivity to NaValp (Fig. 4A). Reinforcing the involvement of BER and NER in the repair of lesion induced by this compound, the quadruple mutant *ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ* showed higher sensitivity in relation to WT, while triple mutant displayed no difference in comparison to WT (Fig. 7A). Thus, it is possible, that ROS accumulation induced by NaValp treatment attack guanine basepaired with cytosine to yield 8-oxoG inducing the recruitment of the specific proteins: Ogg1p and Rad1p-Rad10p complex. However, if 8-oxoG is encountered during replication, local sequence context will determine whether the polymerases stalls at or bypasses the lesion [38]. Thus, possibly, NaValp induced damage is tolerated by TLS repair that generates insertion of any base or an abasic site directly opposite to the VA-induced DNA lesion. In this sense, the strains mutants *rev3Δ* (deficient in the catalytic subunit of DNA polymerase zeta), *rev1Δ* (deficient in the deoxycytidyl transferase, that forms a complex with DNA polymerase zeta) and *rad30Δ* (lacks polymerase eta) [39][40][41] showed sensitivity to NaValp exposure (Fig. 5A). The *rad30Δ* strain was more sensitive to NaValp than *rev1Δ* and *rev3Δ* (Fig. 5A). These data suggest that possibly Rad30p preferentially act on the tolerance to damage induced by the NaValp in relation to Rev1p and Rev3p. Rad30p can promote error-free DNA repair, these results could explain the absence of mutagenesis in XV185-14c treated with NaValp (Table 2); however, more research is needed to affirm that NaValp enables error-free TLS. Interestingly, deficiencies in the PRR, HR and NHEJ pathway did not influence on the sensitivity to NaValp treatment (Fig. 5A and 6A).

In relation to organometallic complexes, the exposure to copper derivatives [Cu₂(Valp)₄] and [Cu(Valp)₂Phen] induced decrease in survival of strains deficient in BER proteins (Ntg1p, Ntg2p, Ogg1p, Rad27p and Apn1p) except for Mag1p and Apn2p (Fig. 3B and 3C). Apn1p, Ntg1p and Ntg2p are important proteins of the BER pathway: Apn1p is the major apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease in *S.cerevisiae*, while Apn2p is a back-up enzyme that accounts for only 10% of cellular AP endonuclease

activity, and Ntg1p and Ntg2p are DNA glycosylases and AP lyases that recognize and remove oxidized purines and pyrimidines [42]. Rad27p is a structure specific flap endonuclease in long-patch base excision repair, is needed to remove 5' deoxyribose phosphate (dRP)-blocked ends, thereby generating a nucleotide gap [43]. Mag1p initiates BER of DNA alkylation damage by removing 3-MeA and other alkylated purines [39]. In addition, double and triple mutant *ntg1Δntg2Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δ* mutants were sensitive to $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ (Fig. 3B and 7B) and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ (Fig. 3C and 7C) reinforcing that both Ntg1p, Ntg2p and Apn1p are important in the repair of copper complexes -induced lesions. Thus, our data indicate that BER enzymes involved in the repair of lesions are induced, most likely indirectly, due to ROS formation by copper complexes exposure. Really, several copper(II) and Phen complexes induce oxidative stress in different cellular types and consequently produce DNA damage [44][45]. For example, the $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^{2+}$ complex was able to induce oxidative damage in DNA [46]. In this sense, the interaction between BER and NER for oxidative DNA damage processing also seems to be true for $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ exposure, once that *rad1Δ* and *rad10Δ* strains showed higher sensitivity than WT (Fig. 4B and 4C) and quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* was more sensitive than triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 7B and 7C). In contrast, the strains defective for BER proteins showed resistance when compared to the WT strain for $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complex (Fig. 3D). This could indicate that BER pathway is recruited for repair of $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ -induced DNA lesions and probably participates in the cytotoxic potential of the drug. However, the strains defective for NER enzymes Rad1p, Rad10p, Rad4p and Rad14p, displayed sensitivity to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ exposure (Fig. 4D). In addition, quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* was less sensitive than single mutant *rad1Δ* (Fig. 4D), reinforcing the BER contribution in $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ toxicity. Besides providing the endonucleolytic activities for incision together with BER, Rad1p-Rad10p complex is also involved in the proper assembly of the NER machinery at the damage site [47]. The Rad4p and Rad14p are proteins that recognize and binds damaged DNA during NER [48]. Thus, apparently NER pathway is important to repair DNA lesion induced by the $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complex.

In the absence of BER/NER proteins, there is an accumulation of AP sites generated after removal of damaged bases, and these are mutagenic and potentially lethal lesions that can block DNA replication and transcription [49]. Restart of stalled

forks can occur through a recombination-associated pathway or mutagenic TLS [38]. The *rad30Δ* strain was weakly more sensitive than WT to organometallic complexes exposure (Fig. 5B-D). Interestingly, the strains defective for Rev1p and Rev3p showed resistance to organometallic complexes treatment in relation to the WT (Fig. 5B-D). This resistance also could be explained considering the possible action of error-free TLS polymerase Rad30p. In this rationale, DNA damage induced by organometallic complexes could be directed to two different DNA repair pathways, depending on the presence of proteins of HR and/or TLS components: (1) HR associated to TLS catalyzed by Rad30p and Rad52p (error-free DNA repair), in Rev1p or Rev3p absence, or (2) TLS, leading to mutant or WT phenotypes (error-prone DNA repair) in Rev1p and Rev3p presence. In fact, organometallic complexes treatment induced base pair substitutions, identified by increase in mutation frequencies at the *his1* and *lys1* loci in XV185-14C strain (Table 2). Moreover, the sensitivity of the *rad52Δ* mutant strain to organometallic complexes (Fig. 6B-D) suggests that HR is important for the processing of genetic lesions induced by organometallic complexes. In addition, after treatment with organometallic complexes, the quadruple mutant for BER and HR (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*) showed the higher sensitivity to $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ or $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ than *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 7B and 7C) and less sensitivity than *rad52Δ* to $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ (Fig. 7D and 6D). These data suggest an interaction of different DNA repair pathways related to tolerance of organometallic complexes damage. Thus, it is possible that BER/NER pathways initiate the repair by recognizing and removing the damaged DNA base leading to strand break formation. Moreover, it is possible that repair intermediates stall the replication forks, resulting in DSBs that are substrates for the HR repair pathway [50]. The use of HR to repair possibly stalled replication forks implies that endonucleases (e.g. Rad1p-Rad10p complex) are needed to resolve the intermediate DNA structures that arise during the recombinational process, like Holliday junctions [51]. Therefore, if not repaired, the DSBs can lead to cell death [50]. Moreover, we observed enhanced sensitivity in *rad50Δ* strain deficient in subunit of the MRX complex (Fig. 6D), which, in addition to its role in the HR, is also involved in DSBs processing by the NHEJ pathway in an error-prone manner [52]. Interestingly, various copper(II) ternary complexes containing Phen, such as $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^{2+}$ complex, showed strong DNA interactions and remarkable capability to cleave DNA [2][46][53]. The $[\text{Cu}_2(\text{Valp})_4]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ complexes also

interact with DNA in vitro and display cleavage activities [55]. Besides the DNA cleavage potential, the possible interaction of organometallic complexes with DNA also can generate stalled replication fork, generating a signal that recruits proteins of HR or TLS pathways. In addition, metal complexes containing Mg can remain more strongly bound to DNA [54][12], which may explain the higher [Mg(Valp)₂Phen] cytotoxicity. Alternatively, PRR could be involved in processing the DNA lesions induced by organometallic complexes that were not removed during replication

Taken together, the copper (II) and Mg complexes with Phen containing VA have an enhanced cytotoxicity when compared to the putative anticancer drug VA and presented different abilities to induce specific DNA damage leading to recruitment of distinct DNA repair pathways. Moreover, these effects taken together with the previous described epigenetic effects of VA, may potentiate the anticancer characteristics of the original drug and possibly be used as chemotherapeutic agents. In addition, the understanding of the DNA damage and repair processes is important in the design of novel therapeutic molecules with higher effect antitumoral or less toxicity for other pharmacological applications.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 no 454929/2014-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS).
Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

- [1] J. Hrebackova, J. Hrabeta, T. Eckschlager, Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors., *Curr. Drug Targets.* 11 (2010) 361–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214599> (accessed January 30, 2017).
- [2] T. Bortolotto, P.P. Silva-Caldeira, C.T. Pich, E.C. Pereira-Maia, H. Terenzi, Tunable DNA cleavage activity promoted by copper(ii) ternary complexes with N-donor heterocyclic ligands, *Chem. Commun.* 52 (2016) 7130–7133. doi:10.1039/c6cc03142k.
- [3] Z. Marinova, Y. Leng, P. Leeds, D.-M. Chuang, Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons, *Neuropharmacology.* 60 (2011) 1109–1115. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.09.022.
- [4] C. Van Lint, S. Emiliani, E. Verdin, The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation., *Gene Expr.* 5 (1996) 245–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8723390> (accessed January 30, 2017).
- [5] M. Kostrouchová, Z. Kostrouch, M. Kostrouchová, Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways., *Folia Biol. (Praha).* 53 (2007) 37–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448293> (accessed May 15, 2017).
- [6] M. Farooq, A. El-Faham, S.N. Khattab, A.M. Elkayal, M.F. Ibrahim, N.A. Taha, A. Baabbad, M.A.M. Wadaan, E.A. Hamed, Biological screening of novel derivatives of valproic acid for anticancer and antiangiogenic properties., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (2014) 7785–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25292064> (accessed May 15, 2017).
- [7] M. Diederich, S. Chateauvieux, F. Morceau, M. Dicato, Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 201 (2010). doi:http://dx.doi.org/10.1155/2010/479364.
- [8] V. Belcastro, C. D'Egidio, P. Striano, A. Verrotti, Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment, *Epilepsy Res.* 107 (2013) 1–8. doi:10.1016/j.eplepsyres.2013.08.016.
- [9] M. Bialer, B. Yagen, Valproic acid: Second generation, *Neurotherapeutics.* 4 (2007) 130–137. doi:10.1016/j.nurt.2006.11.007.
- [10] J. Yang, X. Sun, W. Mao, M. Sui, J. Tang, Y. Shen, Conjugate of Pt(IV)–Histone Deacetylase Inhibitor as a Prodrug for Cancer Chemotherapy, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2793–2800. doi:10.1021/mp200597r.
- [11] P.R. Dos Santos, M.R. Ely, F. Dumas, S. Moura, Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn(II) complex containing 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine with valproic acid, *Polyhedron.* 90 (2015) 239–244. doi:10.1016/j.poly.2015.02.012.
- [12] J. Anastassopoulou, T. Theophanides, Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 79–91. doi:10.1016/S1040-8428(02)00006-9.
- [13] S. Raghunathan, R.K. Goyal, B.M. Patel, Selective inhibition of HDAC2 by magnesium valproate attenuates cardiac hypertrophy, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95 (2017) 260–267. doi:10.1139/cjpp-2016-0542.
- [14] M. Sylla-Iyarreta Veitía, F. Dumas, G. Morgant, J.R.J. Sorenson, Y. Frapart, A. Tomas, Synthesis, structural analysis and anticonvulsant activity of a ternary

- Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid, *Biochimie*. 91 (2009) 1286–1293. doi:10.1016/j.biochi.2009.06.015.
- [15] S.I.M. Veitía, F. Dumas, G. Morgant, US Patent Application Publication, S. Veitia, F. Dumas, G. Morgant, US Patent 2012/0142658A1, 2012.
- [16] Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, Y. Zhu, Z. Guo, Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1951–1972. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.013.
- [17] X.Q. Zhou, Y. Li, D.Y. Zhang, Y. Nie, Z.J. Li, W. Gu, X. Liu, J.L. Tian, S.P. Yan, Copper complexes based on chiral Schiff-base ligands: DNA/BSA binding ability, DNA cleavage activity, cytotoxicity and mechanism of apoptosis, *Eur. J. Med. Chem.* 114 (2016) 244–256. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.055.
- [18] J.D. Ranford, P.J. Sadler, D.A. Tocher, G. Maccarrone, M.C. Riello, E. Rizzarelli, S. Sciuto, M. Sola, Cytotoxicity and antiviral activity of transition-metal salicylato complexes and crystal structure of Bis(diisopropylsalicylato)(1,10-phenanthroline)copper(II), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 36 (1993) 3393. doi:10.1039/dt9930003393.
- [19] I. Correia, S. Roy, C.P. Matos, S. Borovic, N. Butenko, I. Cavaco, F. Marques, J. Lorenzo, A. Rodríguez, V. Moreno, J.C. Pessoa, Vanadium(IV) and copper(II) complexes of salicylaldimines and aromatic heterocycles: Cytotoxicity, DNA binding and DNA cleavage properties, *J. Inorg. Biochem.* 147 (2015) 134–146. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.02.021.
- [20] R. Buchtík, Z. Trávníček, J. Vančo, R. Herchel, Z. Dvořák, Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(ii) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone, *Dalt. Trans.* 40 (2011) 9404. doi:10.1039/c1dt10674k.
- [21] C. Santini, M. Pelli, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862. doi:10.1021/cr400135x.
- [22] D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M.A. Cater, Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”., *Metallomics*. 7 (2015) 1459–1476. doi:10.1039/c5mt00149h.
- [23] O.A. Botrugno, T. Robert, F. Vanoli, M. Foiani, S. Minucci, Molecular Pathways: Old Drugs Define New Pathways: Non-Histone Acetylation at the Crossroads of the DNA Damage Response and Autophagy, *Clin Cancer Res.* 18 (n.d.) 2436–42. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0767.
- [24] N. Makita, I. Ninomiya, T. Tsukada, K. Okamoto, S. Harada, S. Nakanuma, S. Sakai, I. Makino, J. Kinoshita, H. Hayashi, K. Oyama, H. Nakagawara, T. Miyashita, H. Tajima, H. Takamura, S. Fushida, T. Ohta, Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells, *Oncol. Rep.* 34 (2015) 1185–92. doi:10.3892/or.2015.4089.
- [25] U. Golla, D. Joseph, R.S. Tomar, Combined Transcriptomics and Chemical-Genetics Reveal Molecular Mode of Action of Valproic acid, an Anticancer Molecule using Budding Yeast Model., *Sci. Rep.* 6 (2016) 35322. doi:10.1038/srep35322.
- [26] D.G. Soares, N.P. Poletto, D. Bonatto, M. Salvador, G. Schwartzmann, J.A.P. Henriques, Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 59–69. doi:10.1016/j.bcp.2005.04.013.

- [27] L. Guintini, R. Charton, F. Peyresaubès, F. Thoma, A. Conconi, Nucleosome positioning, nucleotide excision repair and photoreactivation in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair (Amst)*. 36 (2015) 98–104. doi:10.1016/j.dnarep.2015.09.012.
- [28] J. Chalissery, D. Jalal, Z. Al-Natour, A.H. Hassan, Repair of Oxidative DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair (Amst)*. 51 (2017) 2–13. doi:10.1016/j.dnarep.2016.12.010.
- [29] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, Cold Spring Harbor Laboratory., *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, 2000 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. :, 2000. <https://searchworks.stanford.edu/view/5058301> (accessed September 19, 2017).
- [30] G. Chen, L.D. Huang, Y.M. Jiang, H.K. Manji, The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3., *J. Neurochem*. 72 (1999) 1327–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037507> (accessed September 19, 2017).
- [31] J.-M. Park, T.-H. Kang, Transcriptional and Posttranslational Regulation of Nucleotide Excision Repair: The Guardian of the Genome against Ultraviolet Radiation., *Int. J. Mol. Sci*. 17 (2016). doi:10.3390/ijms17111840.
- [32] Z. Zhou, N. Humphryes, P. van Eijk, R. Waters, S. Yu, R. Kraehenbuehl, E. Hartsuiker, S.H. Reed. UV induced ubiquitination of the yeast Rad4–Rad23 complex promotes survival by regulating cellular dNTP pools, *Nucleic Acids Res*. 43 (2015) 7360–7370. doi:10.1093/nar/gkv680.
- [33] N. MUTOH, S. KITAJIMA, S. ICHIHARA, Apoptotic Cell Death in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Induced by Valproic Acid and Its Extreme Susceptibility to pH Change, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75 (2011) 1113–1118. doi:10.1271/bbb.110019.
- [34] K. Mitsui, D. Nakagawa, M. Nakamura, T. Okamoto, K. Tsurugi, Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast, *FEBS Lett*. 579 (2005) 723–727. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.051.
- [35] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gómez, Copper compounds in cancer chemotherapy., *Curr. Med. Chem*. 17 (2010) 3606–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846116> (accessed September 21, 2017).
- [36] N. Mukherjee, S. Podder, S. Banerjee, S. Majumdar, D. Nandi, A.R. Chakravarty, Targeted photocytotoxicity by copper(II) complexes having vitamin B6 and photoactive acridine moieties, *Eur. J. Med. Chem*. 122 (2016) 497–509. doi:10.1016/j.ejmech.2016.07.003.
- [37] J. Lv, C. Du, W. Wei, Z. Wu, G. Zhao, Z. Li, X. Xie, The Antiepileptic Drug Valproic Acid Restores T Cell Homeostasis and Ameliorates Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *J. Biol. Chem*. 287 (2012) 28656–28665. doi:10.1074/jbc.M112.356584.
- [38] S. Boiteux, M. Guillet, Abasic sites in DNA: Repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair (Amst)*. 3 (2004) 1–12. doi:10.1016/j.dnarep.2003.10.002.
- [39] J.M. Tkach, A. Yimit, A.Y. Lee, M. Riffle, M. Costanzo, D. Jaschob, J.A. Hendry, J. Ou, J. Moffat, C. Boone, T.N. Davis, C. Nislow, G.W. Brown, Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress, *Nat. Cell Biol*. 14 (2012) 966–976. doi:10.1038/ncb2549.
- [40] A. V. Makarova, J.L. Stodola, P.M. Burgers, A four-subunit DNA

- polymerase complex containing Pol accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 11618–11626. doi:10.1093/nar/gks948.
- [41] E. Envervald, E. Lindgren, Y. Katou, K. Shirahige, L. Ström, Importance of Pol η for damage-induced cohesion reveals differential regulation of cohesion establishment at the break site and genome-wide., *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003158. doi:10.1371/journal.pgen.1003158.
- [42] Z. Abedin, M. Louis-Juste, M. Stangl, J. Field, The role of base excision repair genes OGG1, APN1 and APN2 in benzo[a]pyrene-7,8-dione induced p53 mutagenesis, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 750 (2013) 121–128. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.10.003.
- [43] Y. Liu, H.-I. Kao, R.A. Bambara, Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism., *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 589–615. doi:10.1146/annurev.biochem.73.012803.092453.
- [44] A. Barilli, C. Atzeri, I. Bassanetti, F. Ingoglia, V. Dall'Asta, O. Bussolati, M. Maffini, C. Mucchino, L. Marchiò, Oxidative Stress Induced by Copper and Iron Complexes with 8-Hydroxyquinoline Derivatives Causes Paraptotic Death of HeLa Cancer Cells, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1151–1163. doi:10.1021/mp400592n.
- [45] J. Cadavid-Vargas, I. Leon, S. Etcheverry, E. Santi, M. Torre, A. Di Virgilio, Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytoand Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 17 (2017) 424–433. doi:10.2174/1871520616666160513130204.
- [46] T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Arii, M. Chikira, P. Tamil Selvi, M. Palaniandavar, Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: Studies on DNA binding properties and nuclease activity, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1205–1219. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.02.020.
- [47] G. Maz'ñ, A.F. Lam, C.K. Ho, M. Kupiec, L.S. Symington, The Rad1-Rad10 nuclease promotes chromosome translocations between dispersed repeats, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 964–971. doi:10.1038/nsmb.2359.
- [48] Y. Li, J. Yan, I. Kim, C. Liu, K. Huo, H. Rao, Rad4 regulates protein turnover at a postubiquitylation step., *Mol. Biol. Cell.* 21 (2010) 177–85. doi:10.1091/mbc.E09-04-0305.
- [49] K.L. Limpose, A.H. Corbett, P.W. Doetsch, BERing the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management, *DNA Repair (Amst).* 56 (2017) 51–64. doi:10.1016/j.dnarep.2017.06.007.
- [50] J.A. Nickoloff, Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* (2017). doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.07.008.
- [51] K. Hanamshet, O. Mazina, A. Mazin, Reappearance from Obscurity: Mammalian Rad52 in Homologous Recombination, *Genes (Basel).* 7 (2016) 63. doi:10.3390/genes7090063.
- [52] J. San Filippo, P. Sung, H. Klein, Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 229–257. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- [53] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.D.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: Cytotoxicity and DNA cleavage, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414–6424. doi:10.1021/ic101791r.

- [54] N.E. Saris, E. Mervaala, H. Karppanen, J.A. Khawaja, A. Lewenstam, Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects., *Clin. Chim. Acta.* 294 (2000) 1–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727669> (accessed January 31, 2017).
- [55] C. T. Pich, P.R. dos Santos, T. V. O. Furtunato, I. M. Oliveira, F. Dumas, H. Terenzi, J. A. P. Henriques and S. Moura. Mixed ternary mononuclear Cu(II) complexes based on valproic acid with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine ligands: DNA interaction and cytotoxicity in V79 cells (Submitted).



Discussão

DISCUSSÃO

O AV é tradicionalmente utilizado no tratamento de esquizofrenia, convulsões e transtorno bipolar (NALIVAEVA et al., 2009). Recentemente, o emprego AV no tratamento de câncer tem sido destacado em diversos estudos (MARINOVA et al., 2011; DE SOUZA; CHATTERJI, 2015). Esse possível uso no tratamento para o câncer está relacionado a capacidade do AV de inibir as proteínas HDAC, influenciando importantes processos celulares, tais como controle do ciclo celular, diferenciação, reparação de DNA, apoptose e senescência (para revisão, ver FAROOQ et al., 2014). Considerando que o AV apresenta limitações de uso devido à sua toxicidade, o desenvolvimento de um fármaco com atividade terapêutica maior que o AV e com menor toxicidade é de grande importância para a ampliação das oportunidades de tratamento de doenças neurológicas e na terapia anticâncer. Consequentemente, a síntese de novos compostos análogos e derivados do AV tem sido realizada para possibilitar o emprego de moléculas com maior atividade farmacológica e menor efeito colateral (para revisão, ver FAROOQ et al., 2014). Neste contexto, o complexo organometálico $[Cu(Valp)_2Phen]$ aumentou consideravelmente a atividade anticonvulsivante do AV em ratos (>3000 vezes) sem aumentar a sua toxicidade (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009). Dados experimentais do nosso laboratório mostram que os compostos organometálicos $[Cu_2(Valp)_4]$ e $[Cu(Valp)_2Phen]$, diferente do AV, podem interagir com o DNA ocasionando sua clivagem *in vitro* (PICH et al., submetido), indicando um possível uso futuro como agentes quimioterápicos. Portanto, as atividades farmacológicas desses compostos apresentam um potencial de utilização promissor. Assim, o entendimento da citotoxicidade, mutagenicidade e reparação de danos ao DNA induzidos por um novo fármaco pode facilitar a identificação de marcadores moleculares para prognosticar a toxicidade para usos farmacológicos e auxiliar no entendimento do mecanismo de ação em possíveis tratamentos para o câncer. Não obstante, muitos aspectos sobre o mecanismo de toxicidade do AV ainda não foram profundamente investigados, como indução de danos no DNA e sobre as vias de reparação. Portanto, nossos resultados contribuem para o aumento desse conhecimento.

No presente trabalho, avaliou-se o potencial citotóxico, mutagênico e a atividade do AV (NaValp) e seus derivados organometálicos - $[Cu_2(Valp)_4]$,

[Cu(Valp)₂Phen] e [Mg(Valp)₂Phen] - sobre a maquinaria de reparação de DNA. Este estudo a compreensão do mecanismo de ação dos complexos, principalmente no ambiente macromolecular, e o possível envolvimento destas vias na atividade tóxica dos agentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Nossos resultados mostram que os complexos organometálicos apresentaram efeitos citotóxicos na maioria das concentrações utilizadas nos testes de sobrevivência após 24 h de exposição em crescimento (Fig. 2B-D – Capítulo I). Tais compostos foram mais citotóxicos que o AV, na seguinte sequência de citotoxicidade: [Mg(Valp)₂Phen] > [Cu₂(Valp)₄] = [Cu(Valp)₂Phen] > NaValp, sendo que os derivados de cobre e magnésio apresentaram uma citotoxicidade cerca de ~25 e ~170 vezes maior do que o NaValp, respectivamente (Figura 2 – Capítulo I). De fato, MITSUI e colaboradores mostraram uma redução de crescimento de *S. cerevisiae* expostas ao AV de maneira dose-dependente, sendo que a completa inibição do crescimento ocorreu na concentração de 100 mM (MITSUI et al., 2005). Além disso pode-se destacar que compostos de cobre podem retardar a progressão do ciclo celular e aumentar a morte celular em diferentes culturas, tornando esses compostos promissores para o desenvolvimento de terapias mais eficientes (SANTINI et al., 2014; DENOYER et al., 2015).

Curiosamente, as células de levedura não apresentaram sensibilidade aos compostos em fase estacionária ou exponencial quando incubadas em PBS sem condições crescimento (dados não mostrados). Como observado por MUTOH e colaboradores, a sensibilidade de *Schizosaccharomyces pombe* ao AV foi fortemente dependente da fase de crescimento (MUTOH; KITAJIMA; ICHIHARA, 2011).

Com o objetivo de aumentar o conhecimento em relação ao mecanismo de toxicidade do NaValp e derivados organometálicos, foi investigado o seu efeito sobre a estabilidade genômica. Na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*, foi possível observar indução de mutações pontuais, nos loci *his1* e *lys1*, evidenciada pela reversão do fenótipo auxotrófico para histidina e lisina, respectivamente, em leveduras expostas aos complexos organometálicos (Tabela 2 - Capítulo I). Nenhum dos compostos provocou reversão da mutação no *locus* da homoserina, sugerindo que os compostos não causam alteração no quadro de leitura (*frameshift mutation*) (Tabela 2 – Capítulo I).

As ações citotóxicas e mutagênicas do NaValp e seus complexos organometálicos derivados estão associadas aos mecanismos pelos quais essas moléculas causam danos ao DNA. Assim, também foi avaliado o envolvimento das vias de reparo de DNA em resposta as lesões induzidas pelo NaValp e seus derivados,

empregando diferentes linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em proteínas envolvidas na reparação do DNA. Os resultados obtidos demonstraram que a proteína Ogg1 da via BER é especialmente importante no reparo de danos induzidos pelo NaValp.

Nossos resultados também indicam a participação da via NER na reparação das lesões provocadas pelo NaValp, uma vez que as linhagens deficientes nas proteínas Rad1p e Rad10p foram sensíveis ao composto (Fig. 4A – Capítulo I). Essa interação foi demonstrada na exposição da linhagem quadruplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* ao NaValp e observou-se redução significativa na viabilidade, enquanto a linhagem triplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δ* apresentou sensibilidade semelhante a selvagem (Figura 7A – Capítulo I).

A indução de estresse oxidativos é um mecanismo importante na toxicidade provocada pelo AV (GOLLA et.al., 2016), e o material genético é um alvo de danos oxidativos que resultam em lesões no DNA, como 8-oxoguanina (ABEDIN et al., 2013). Somado a estes fatos, a sensibilidade da linhagem *ogg1Δ* indica que o AV induz danos oxidativos no DNA do tipo 8-oxoguanina (para revisão, ver ABEDIN et al., 2013). É importante ressaltar que as vias BER e NER podem interagir no processamento de danos no DNA, tais como o reparo de lesões oxidativas de timina glicol e 8-oxoguanina, e na reparação de sítios abásicos (BOITEUX; GUILLET, 2004).

Os mutantes em TLS (*rev1Δ*, *rev3Δ* e *rad30Δ*) também foram sensíveis ao NaValp, especialmente a linhagem deficiente em Rad30p (Figura 5A – Capítulo I). Esses resultados sugerem que Rad30p pode atuar preferencialmente na tolerância ao dano induzido pelo AV, em relação a Rev1p e Rev3p.

É possível que o AV induza a formação de lesões no DNA capazes de bloquear a replicação, como glioxal ou timina glicol, que, se não for removida por BER, pode recrutar a via TLS. O dano induzido é tolerado pela via TLS, envolvendo polimerases especializadas, que podem executar a síntese de DNA livre de erros ou sujeita a erro (para revisão, ver DIANOV; HUBSCHER, 2013). Assim, os resultados sugerem que Rad30p pode atuar preferencialmente na tolerância ao dano induzido pelo NaValp, em relação a Rev1p e Rev3p. Como Rad30p pode promover a tolerância ao dano livre de erro (CHATTERJEE; PABLA; SIEDE, 2013), tais resultados poderiam explicar a ausência de mutagênese na linhagem XV185-14c tratada com NaValp (Tabela 2 – Capítulo I).

As linhagens deficientes em PRR (*rad6Δ* e *rad18Δ*), HR (*rad52Δ*) e NHEJ (*rad50Δ*) não apresentaram sensibilidade ao NaValp (Figura 5A e 6A – Capítulo I), sugerindo que estas vias tenham pouca ou nenhuma participação no processamento das lesões induzidas por este composto. É interessante ressaltar que MAKITA e colaboradores (2015) mostraram o potencial do AV de inibir as vias de reparação de DSBs pela acetilação da proteína p53 na cascata de sinalização de DSB e pela acetilação da proteína Ku70 na NHEJ, bem como a supressão dos níveis de expressão de Rad51 na HR, inibindo HR e NHEJ no processo de reparo DSB (MAKITA et al., 2015).

As lesões induzidas pelos complexos de cobre $[Cu_2(Valp)_4]$ e $[Cu(Valp)_2Phen]$ podem ser reparadas pela via BER, pelas proteínas Ogg1, Ntg1, Ntg2, Rad27 e Apn1 (Figuras 3B e 3C – Capítulo I). Ainda, também parece ocorrer a interação de BER e NER para o processamento de danos no DNA ocasionado por estes compostos, uma vez que as linhagens *rad1Δ* e *rad10Δ* apresentaram maior sensibilidade em comparação a linhagem selvagem (Fig. 4B e 4C – Capítulo I). Reforçando esta evidência, a linhagem quadruplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* foi mais sensíveis do que a triplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 7B e 7C – Capítulo I).

Os íons de cobre são capazes de interagir com as proteínas nucleares, causando danos oxidativos (BARILLI et al., 2014; CADAVID-VARGAS et al., 2017). Assim, a toxicidade do cobre pode vir da sua capacidade de produzir ERO, deslocando outros íons metálicos e induzindo peroxidação lipídica (BURROWS; MULLER, 1998; BORTOLOTTTO et al., 2016). Dessa forma, complexos metálicos de cobre e outros metais podem atuar como mediadores da oxidação do DNA (RAMAKRISHNAN et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2016). Realmente, vários complexos de cobre(II) induzem estresse oxidativo em diferentes tipos de células e, conseqüentemente, produzem danos ao DNA (BARILLI et al., 2014; CADAVID-VARGAS et al., 2017). Ainda, os complexos de cobre com 1,10-fenantrolina também estão associados à formação de ERO e induzem lesões no DNA (BORTOLOTTTO et al., 2016). Um exemplo bem estudado é o composto $[Cu(Phen)_2]^{2+}$, que é reduzido *in situ* a $[Cu(Phen)_2]^+$, ligando-se ao sulco menor da dupla fita; em seguida, produz espécies de cobre-oxo na superfície do DNA, sendo diretamente responsável pelo dano oxidativo (para revisão, ver HIROHAMA et al., 2005; SILVA et al., 2014).

As linhagens deficientes em proteínas da via BER apresentaram resistência ao [Mg(Valp)₂Phen], sugerindo que esta via pode inclusive contribuir na formação das lesões provocadas por esta molécula (Figura 3D – Capítulo I). Em contraste, a via NER é importante para reparar lesões no DNA induzidas pelo composto [Mg(Valp)₂Phen], evidenciado pelo fato das linhagens deficientes nas enzimas Rad1p, Rad10p, Rad4p e Rad14p apresentarem sensibilidade ao complexo (Fig. 4D – Capítulo I). Além disso, a linhagem quadruplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* foi menos sensível que a simples mutante *rad1Δ* (Fig. 4D – Capítulo I), reforçando a contribuição de BER na toxicidade de [Mg(Valp)₂Phen] e a importância de NER. O complexo Rad1p-Rad10p, além de fornecer atividade endonucleolítica, está envolvido na montagem adequada da maquinaria de NER no sítio do dano (MAZIN et al., 2012).

Caso as vias BER/NER não reparem o dano, a reparação pode ser canalizada para as vias HR ou TLS. Assim, diferente do observado na exposição ao AV, as linhagens *rev1Δ* e *rev3Δ* foram resistentes, enquanto a *rad30Δ* foi consideravelmente mais sensível que a linhagem selvagem aos complexos organometálicos (Figuras 5B-D – Capítulo I). Portanto, os danos ao DNA causados pelos complexos organometálicos podem ter a reparação direcionada para duas vias, dependendo da presença de proteínas de HR e/ou TLS: (1) HR associado a TLS catalisado por Rad30p e Rad52p (sem erros), na ausência de Rev1p ou Rev3p, ou (2) na reparação por TLS, ocasionando mutações (propenso a erros) na presença de Rev1p e Rev3p. De fato, o tratamento com os complexos organometálicos induziu substituições de pares de bases, identificadas pelo aumento da frequência de mutação nos loci *his1* e *lys1* da linhagem XV185-14C (Tabela 2 – Capítulo I). A sensibilidade de *rad52Δ* pelos complexos organometálicos (Fig. 6B-D – Capítulo I) sugere que a via HR é importante no processamento de lesões ao DNA ocasionadas por esses compostos.

Ainda, os resultados sugerem uma interação de diferentes vias para o reparo aos danos no DNA produzidos pelos complexos organometálicos. Esse aspecto é evidenciado pelo fato de que o quádruplo mutante de genes da via BER e HR (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*) apresentou alta sensibilidade a [Cu₂(Valp)₄] e [Cu(Valp)₂Phen] quando comparado ao triplo mutante apenas de genes de BER *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 7B e 7C – Capítulo I) e menor sensibilidade ao complexo [Mg(Valp)₂Phen] do que *rad52Δ* (Fig. 7D e 6D – Capítulo I).

Desta forma, é possível que as vias BER e NER possam iniciar o reparo reconhecendo e removendo a base danificada, e assim, levando à formação de quebras na fita do DNA. Além disso, é possível que reparos intermediários paralise a forquilha de replicação, resultando em DSBs que são substratos para a via HR atuar. Caso o dano não for reparado, as DSBs podem levar à morte celular (NICKOLOFF, 2017). Observamos também uma maior sensibilidade da linhagem *rad50Δ*, subunidade do complexo MRX (Fig. 6D – Capítulo I), que, além de seu papel na via HR, também está envolvida no processamento de DSBs pela via NHEJ (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008).

Os complexos $[Cu_2(Valp)_4]$ e $[Cu(Valp)_2Phen]$ podem interagir com o DNA *in vitro* e provocarem sua clivagem (PICH et al., manuscrito submetido), mas ainda não há dados nesse sentido em relação ao composto $[Mg(Valp)_2Phen]$. No entanto, pode-se destacar que complexos metálicos contendo magnésio são capazes de permanecer mais fortemente ligados ao DNA (ANASTASSOPOULOU; THEOPHANIDES, 2002). Seguindo esse raciocínio, uma possível ligação mais forte do complexo $[Mg(Valp)_2Phen]$ com o DNA pode ajudar a explicar a maior citotoxicidade do composto em relação aos demais. Ainda, o ligante 1,10-fenantrolina é utilizado em vários complexos metálicos para ampliar a capacidade dos compostos de intercalar-se no DNA e potencializar a clivagem (RAJALAKSHMI; KIRAN; NAIR, 2014; ZHOU et al., 2016).

As diferentes vias de reparo participantes nos processamentos das lesões induzidas para cada composto, resumidas na tabela 6, podem inferir os possíveis tipos de danos induzidos pelos agentes. Essas diferenças podem ser devidas a adição de ligantes e sobretudo dos metais nas moléculas, bem como o tipo de metal adicionado. Assim, as alterações nas moléculas em relação ao composto original possibilitaram a demonstração de novos efeitos biológicos com mecanismos de ação distintos. Desta forma, os novos efeitos biológicos encontrados podem ser explorados para um possível futuro emprego em terapias antiproliferativas. Ainda, foi possível ampliar o entendimento dos mecanismos tóxicos do AV, uma vez que sua ação no DNA ainda é pouco conhecida.

Tabela 6: Resumo das proteínas participantes de cada via de reparação de DNA na resposta ao respectivo complexo

| Composto/Via de Reparo | BER | NER | TLS | PRR | HR | NHEJ |
|---|--|--------------------------------|-----------------------|--------------|-----------|-------------|
| NaValp | Ogg1 | Rad1 Rad10 | Rev1 Rev3 Rad30 | NS | NS | NS |
| [Cu₂(Valp)₄] | Ogg1 | Rad1 | Rev1 | Rad6 | Rad52 | Rad50 |
| [Cu(Valp)₂Phen] | Ntg1 Ntg2 Rad27 Apn1 | Rad10 | Rev3 Rad30 | Rad8 | | |
| [Mg(Valp)₂Phen] | Ogg1 Ntg1 Ntg2 Apn1A pn2 Mag1 | Rad1R ad10 Rad8 Rad14 | Rev1 Rev3 Rad30 | Rad6 Rad8 | Rad52 | Rad50 |

NS = não significativo



Conclusões

Conclusão geral

O presente estudo mostrou que os complexos organometálicos são mais citotóxicos que o AV em *S. cerevisiae* e as lesões no DNA induzidas por esta molécula e seus derivados são distintas. Por consequência, recruta mecanismos de reparação específicos para o tipo particular de lesão provocado por cada um dos compostos. Essas particularidades se devem, provavelmente, as alterações realizadas na molécula de AV pela inclusão de cobre ou magnésio e o ligante 1,10-fenantrolina.

Conclusões específicas

- A redução da viabilidade celular nas linhagens testadas ocorreu apenas na exposição de 24 h em meio de cultivo em condições de crescimento.
- Os complexos organometálicos foram mais citotóxicos que o AV, e o [Mg(Valp)₂Phen] apresentou a maior citotoxicidade.
- Os complexos organometálicos induziram mutações pontuais (*missense*), enquanto o AV não apresentou potencial mutagênico.
- O AV induz a formação de lesões no DNA reparadas pelas vias BER, NER e TLS.
- Os complexos [Cu₂(Valp)₄] e [Cu(Valp)₂Phen] induzem a formação de lesões no DNA que levam ao recrutamento das vias BER, NER, HR, TLS e PRR.
- O complexo [Mg(Valp)₂Phen] induz a formação de lesões no DNA processadas pelas vias NER, TLS, HR, NHEJ e PRR.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

Seria de importância para a continuação do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito dos efeitos biológicos do AV e derivados organometálicos em levedura, buscar o entendimento mais aprofundado dos seus mecanismos de toxicidade pela investigação do seu efeito no remodelamento de cromatina e a relação desses processos com a reparação de DNA, possível produção de ERO e interação com o DNA (no caso do composto de magnésio, ainda não caracterizado neste sentido):

- Verificar, em levedura, a participação da indução de estresse oxidativos na citotoxicidade do AV e derivados pelo emprego de N-acetilcisteína, em condições de pré-tratamento, nos ensaios de sobrevivência e mutagênese e análises mais refinadas como dosagem do acúmulo de ERO, indução de peroxidação lipídica e alteração na atividade de enzimas antioxidantes.
- Investigar a participação de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina e sua interface com os processos de reparação de DNA nas lesões induzidas pelo AV e seus derivados organometálicos utilizando linhagens mutantes de *S. cerevisiae*.
- Caracterizar a capacidade de interação do DNA do $[Mg(Valp)_2Phen]$ por sua atividade de nuclease e pelo dicróismo circular e, ainda, avaliar sua capacidade de necrose a apoptose em células de mamíferos.



Referências

Referências

- ABBOTTS, R.; WILSON, D. M. Coordination of DNA single strand break repair. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.
- ABEDIN, Z. et al. The role of base excision repair genes OGG1, APN1 and APN2 in benzo[a]pyrene-7,8-dione induced p53 mutagenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 750, n. 1–2, p. 121–128, 20 jan. 2013.
- ACEVEDO-TORRES, K. et al. Requirement of the *Saccharomyces cerevisiae* APN1 gene for the repair of mitochondrial DNA alkylation damage. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 50, n. 4, p. 317–27, maio 2009.
- AIRES, C. C. P. et al. New insights on the mechanisms of valproate-induced hyperammonemia: Inhibition of hepatic N-acetylglutamate synthase activity by valproyl-CoA. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 426–434, ago. 2011.
- ANASTASSOPOULOU, J.; THEOPHANIDES, T. Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 79–91, 2002.
- ANDERSEN, P. L.; XU, F.; XIAO, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 162–173, jan. 2008.
- ARINZE, I. J.; KAWAI, Y. Sp Family of Transcription Factors Is Involved in Valproic Acid-induced Expression of G i2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 17785–17791, 16 maio 2003.
- ATAIAN, Y.; KREBS, J. E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 490–494, ago. 2006.
- BAKER, W. L. Treating arrhythmias with adjunctive magnesium: identifying future research directions. **European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy**, p. pvw028, 15 set. 2016.
- BARILLI, A. et al. Oxidative Stress Induced by Copper and Iron Complexes with 8-Hydroxyquinoline Derivatives Causes Paraptotic Death of HeLa Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1151–1163, 7 abr. 2014.
- BATEMAN, S. W. A Quick Reference on Magnesium. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 47, n. 2, p. 235–239, mar. 2017.
- BAUER, N. C.; CORBETT, A. H.; DOETSCH, P. W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 21, p. gkv1136, 30 out. 2015.
- BENCINI, A.; LIPPOLIS, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17–18, p. 2096–2180, 2010.

- BHAVSAR-JOG, Y. P.; BI, E. Mechanics and regulation of cytokinesis in budding yeast. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 27 dez. 2016.
- BIALER, M.; YAGEN, B. Valproic acid: Second generation. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 130–137, jan. 2007.
- BILLINGSLEY, J. M.; DENICOLA, A. B.; TANG, Y. Technology development for natural product biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 74–83, dez. 2016.
- BOITEUX, S.; GUILLET, M. Abasic sites in DNA: Repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2004.
- BOITEUX, S.; JINKS-ROBERTSON, S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, n. 4, p. 1025–1064, 1 abr. 2013.
- BORTOLOTTI, T. et al. Tunable DNA cleavage activity promoted by copper(ii) ternary complexes with N-donor heterocyclic ligands. **Chemical Communications**, v. 52, n. 44, p. 7130–7133, 2016.
- BROOMFIELD, S.; HRYCIW, T.; XIAO, W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation research**, v. 486, n. 3, p. 167–84, 9 ago. 2001.
- BROWN, J. S.; JACKSON, S. P. Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response. **Open Biology**, v. 5, n. 4, p. 150018–150018, 1 abr. 2015.
- BUCHTIK, R. et al. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(ii) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 37, p. 9404, 2011.
- BUNTING, S. F.; NUSSENZWEIG, A. End-joining, translocations and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 7, p. 443–454, 13 jun. 2013.
- BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. **Chemical reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109–1152, 7 maio 1998.
- CADAVID-VARGAS, J. et al. Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 424–433, 20 fev. 2017.
- CHALISSERY, J. et al. Repair of Oxidative DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair**, v. 51, p. 2–13, mar. 2017.
- CHATTERJEE, N.; PABLA, R.; SIEDE, W. Role of polymerase η in mitochondrial mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 431, n. 2, p. 270–273, 8 fev. 2013.
- CHENG, C. et al. Development of stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by metabolic engineering: New aspects from cell flocculation and zinc supplementation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 2, p. 141–146, fev. 2017.
- CHI, B.; TAO, S.; LIU, Y. Physiologically Shrinking the Solution Space of a *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Scale Model Suggests the Role of the Metabolic Network in Shaping Gene Expression Noise. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10,

p. e0139590, 8 out. 2015.

- COHEN, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 115–120, abr. 2007.
- DASTIDAR, R. et al. The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation. **Cell & Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 30, 2012.
- DE FELICE, L. et al. Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Enhances the Cytokine-Induced Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 4, p. 1505–1513, 15 fev. 2005.
- DE SOUZA, C.; CHATTERJI, B. P. HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 10, n. 2, p. 145–62, 2015.
- DENOYER, D. et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”. **Metallomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 2015.
- DEVER, T. E.; KINZY, T. G.; PAVITT, G. D. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 65–107, 1 maio 2016.
- DIANOV, G. L.; HUBSCHER, U. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 1 abr. 2013.
- DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016.
- DUENAS-GONZALEZ, A. et al. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 3, p. 206–222, maio 2008.
- DUJON, B. Yeast evolutionary genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 512–524, jul. 2010.
- DURANDO, M.; TATEISHI, S.; VAZIRI, C. A non-catalytic role of DNA polymerase η in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 5, p. 3079–93, 1 mar. 2013.
- EL-FAHAM, A. et al. Synthesis and Biological Activity of Schiff Base Series of Valproyl, N-Valproyl Glycinyll, and N-Valproyl-4-aminobenzoyl Hydrazide Derivatives. **Chem. Pharm. Bull**, v. 62, n. 6, p. 591–599, 2014.
- ELDAROV, M. A. et al. Genomics and biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 13, p. 1650–1668, 6 dez. 2016.
- EYAL, S. et al. Histone deacetylases inhibition and tumor cells cytotoxicity by CNS-active VPA constitutional isomers and derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1501–1508, 15 maio 2005.
- FAROOQ, M. et al. Biological screening of novel derivatives of valproic acid for anticancer and antiangiogenic properties. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 18, p. 7785–92, 2014.
- FAWCETT, W. J.; HAXBY, E. J.; MALE, D. A. Magnesium: physiology and

- pharmacology. **British journal of anaesthesia**, v. 83, n. 2, p. 302–20, ago. 1999.
- FELISBINO, M. B. et al. Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29144, 19 dez. 2011.
- FERNANDES, A. S. et al. Development of pyridine-containing macrocyclic copper(II) complexes: potential role in the redox modulation of oxaliplatin toxicity in human breast cells. **Free Radical Research**, v. 46, n. 9, p. 1157–1166, 20 set. 2012.
- FREUDENTHAL, B. D. et al. Structure of monoubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 479–84, abr. 2010.
- FREZZA, M. et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 16, p. 1813–25, jun. 2010.
- GAN, G. N. et al. DNA polymerase zeta (pol ζ) in higher eukaryotes. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 174–183, jan. 2008.
- GAO, Y. et al. Mechanisms of Post-Replication DNA Repair. **Genes**, v. 8, n. 2, p. 64, 8 fev. 2017.
- GIBSON, T. A.; GOLDBERG, D. S. Reverse engineering the evolution of protein interaction networks. **Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing**, p. 190–202, 2009.
- GOLLA, U.; JOSEPH, D.; TOMAR, R. S. Combined Transcriptomics and Chemical-Genetics Reveal Molecular Mode of Action of Valproic acid, an Anticancer Molecule using Budding Yeast Model. **Scientific reports**, v. 6, n. October, p. 35322, 2016.
- GREENE, E. C. DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 22, p. 11572–11580, 27 maio 2016.
- GRIFFITHS, L. M. et al. Dynamic compartmentalization of base excision repair proteins in response to nuclear and mitochondrial oxidative stress. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 3, p. 794–807, fev. 2009.
- GRUBMAN, A.; WHITE, A. R. Copper as a key regulator of cell signalling pathways. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 16, p. e11, 22 maio 2014.
- GUINTINI, L. et al. Nucleosome positioning, nucleotide excision repair and photoreactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair**, v. 36, p. 98–104, dez. 2015.
- HANAMSHET, K.; MAZINA, O.; MAZIN, A. Reappearance from Obscurity: Mammalian Rad52 in Homologous Recombination. **Genes**, v. 7, n. 9, p. 63, 14 set. 2016.
- HARACSKA, L. et al. Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. **Genes & development**, v. 15, n. 8, p. 945–54, 15 abr. 2001.
- HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1217–1235, nov. 2008.

- HIROHAMA, T. et al. Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: Studies on DNA binding properties and nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1205–1219, maio 2005.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475–1485, 8 out. 2009.
- HORDYJEWSKA, A.; POPIOŁEK, Ł.; KOCOT, J. The many “faces” of copper in medicine and treatment. **BioMetals**, v. 27, n. 4, p. 611–621, 20 ago. 2014.
- HOWARD, S. M. et al. DNA Damage Response Factors from Diverse Pathways, Including DNA Crosslink Repair, Mediate Alternative End Joining. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 1, p. e1004943, 28 jan. 2015.
- HREBACKOVA, J.; HRABETA, J.; ECKSCHLAGER, T. Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. **Current drug targets**, v. 11, n. 3, p. 361–79, mar. 2010.
- HUANG, B. H. et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 4, p. 395–404, 21 abr. 2005.
- IAKOVIDIS, I.; DELIMARIS, I.; PIPERAKIS, S. M. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. **Molecular biology international**, v. 2011, p. 594529, 2011.
- ISHCHENKO, A. A. et al. The 3'->5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 15, p. 6380–90, ago. 2005.
- JANSEN, J. G.; TSAALBI-SHTYLIK, A.; DE WIND, N. Roles of mutagenic translesion synthesis in mammalian genome stability, health and disease. **DNA Repair**, v. 29, p. 56–64, maio 2015.
- JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 94, n. 2, p. 166–200, jul. 2011.
- JOHANNESSEN, C. U.; JOHANNESSEN, S. I. Valproate: past, present, and future. **CNS drug reviews**, v. 9, n. 2, p. 199–216, 2003.
- JOHNSON, R. E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5404, p. 1001–4, 12 fev. 1999.
- KAES, C.; KATZ, A.; HOSSEINI, M. W. Bipyridine: The most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2,2'-bipyridine units. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 3553–3590, 2000.
- KAKAROUGKAS, A.; JEGGO, P. A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. **The British Journal of Radiology**, v. 87, n. 1035, p. 20130685, mar. 2014.
- KELLETT, A. et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 3, p. 564–76, ago. 2012.
- KIRPNICK, Z. et al. Yeast DEL assay detects clastogens. **Mutation Research/Genetic**

- Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 582, n. 1–2, p. 116–134, 4 abr. 2005.
- KNIGHT, A. W. et al. An analysis of results from 305 compounds tested with the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay (GreenScreen GC) including relative predictivity of regulatory tests and rodent carcinogenesis and performance with autofluorescent and coloured compounds. **Mutagenesis**, v. 22, n. 6, p. 409–416, 20 ago. 2007.
- KOWOL, C. R. et al. Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 409–423, 22 mar. 2012.
- KOZMIN, S. et al. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13538–43, 20 set. 2005.
- KRAMER, J. A.; SAGARTZ, J. E.; MORRIS, D. L. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 636–649, 2007.
- KRUIS, W.; PHUONG NGUYEN, G. Iron Deficiency, Zinc, Magnesium, Vitamin Deficiencies in Crohn's Disease: Substitute or Not? **Digestive Diseases**, v. 34, n. 1–2, p. 105–111, 16 mar. 2016.
- LAFON, A. et al. MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5373–5384, 13 ago. 2007.
- LEE, K.; MYUNG, K. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. **Molecules and cells**, v. 26, n. 1, p. 5–11, 31 jul. 2008.
- LEHRMAN, G. et al. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. **The Lancet**, v. 366, n. 9485, p. 549–555, ago. 2005.
- LI, W.; LI, S. Facilitators and Repressors of Transcription-coupled DNA Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p. 259–267, jan. 2017.
- LI, Y. et al. Rad4 regulates protein turnover at a postubiquitylation step. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 1, p. 177–85, 1 jan. 2010.
- LIU, L.; LEE, J.; ZHOU, P. Navigating the nucleotide excision repair threshold. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n. 3, p. 585–9, set. 2010.
- LORENZ, D. R.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J. A network biology approach to aging in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1145–1150, 27 jan. 2009.
- LÖSCHER, W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. **CNS drugs**, v. 16, n. 10, p. 669–94, 2002.
- LUIS, P. B. M. et al. Role of Isovaleryl-CoA Dehydrogenase and Short Branched-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase in the Metabolism of Valproic Acid: Implications for the Branched-Chain Amino Acid Oxidation Pathway. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 7, p. 1155–1160, 1 jul. 2011.
- MAKAROVA, A. V.; STODOLA, J. L.; BURGERS, P. M. A four-subunit DNA

- polymerase complex containing Pol accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. 11618–11626, 1 dez. 2012.
- MAKITA, N. et al. Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 34, n. 3, p. 1185–92, 26 jun. 2015.
- MARINOVA, Z. et al. Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7–8, p. 1109–1115, jun. 2011.
- MARZANO, C. et al. Copper complexes as anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 9, n. 2, p. 185–211, fev. 2009.
- MAZIN, G. et al. The Rad1-Rad10 nuclease promotes chromosome translocations between dispersed repeats. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 9, p. 964–971, 12 ago. 2012.
- MEADOWS, K. L.; SONG, B.; DOETSCH, P. W. Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 19, p. 5560–5567, 1 out. 2003.
- MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, fev. 2015.
- MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chemical Communications**, n. 9, p. 1001, 7 mar. 2009.
- MÉNDEZ-ACUÑA, L. et al. Histone Post-Translational Modifications in DNA Damage Response. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, n. 1–3, p. 28–36, 2010.
- MILLER-FLEMING, L.; GIORGINI, F.; OUTEIRO, T. F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 3, p. 325–338, mar. 2008.
- MIN, J.-H.; PAVLETICH, N. P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 570–575, 4 out. 2007.
- MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 38–51, jan. 2006.
- MISTELI, T.; SOUTOGLOU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 11 abr. 2009.
- MITSUI, K. et al. Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 723–727, 31 jan. 2005.
- MLADENOV, E.; ILIAKIS, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n.

- 1–2, p. 61–72, 3 jun. 2011.
- MONERAWELA, C.; BOND, U. Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. **Biotechnology Advances**, 8 mar. 2017.
- MUKHERJEE, N. et al. Targeted photocytotoxicity by copper(II) complexes having vitamin B6 and photoactive acridine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 497–509, out. 2016.
- MUSTACCHI, R.; HOHMANN, S.; NIELSEN, J. Yeast systems biology to unravel the network of life. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 227–238, fev. 2006.
- MUTOH, N.; KITAJIMA, S.; ICHIHARA, S. Apoptotic Cell Death in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Induced by Valproic Acid and Its Extreme Susceptibility to pH Change. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 6, p. 1113–1118, 23 jun. 2011.
- NALIVAEVA, N. N. et al. Sodium valproate: an old drug with new roles. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 10, p. 509–14, out. 2009.
- NANAU, R. M.; NEUMAN, M. G. Adverse drug reactions induced by valproic acid. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 1323–1338, 2013.
- NEMZOW, L. et al. XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before. **DNA Repair**, v. 36, p. 19–27, dez. 2015.
- NEUMAN, M. G. et al. CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 211–218, 2001.
- NEUMAN, M. G. et al. Valproic acid derivatives signal for apoptosis and repair in vitro. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 1532–1537, out. 2013.
- NICKOLOFF, J. A. Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 24 jul. 2017.
- O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, v. 60, n. 4, p. 547–560, 19 nov. 2015.
- OKADA, A. et al. Amidic modification of valproic acid reduces skeletal teratogenicity in mice. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 71, n. 1, p. 47–53, fev. 2004.
- PALOMERA-SANCHEZ, Z.; ZURITA, M. Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. **DNA Repair**, v. 10, n. 2, p. 119–125, 7 fev. 2011.
- PARK, J.-M.; KANG, T.-H. Transcriptional and Posttranslational Regulation of Nucleotide Excision Repair: The Guardian of the Genome against Ultraviolet Radiation. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, 4 nov. 2016.
- PARKER, J. L.; ULRICH, H. D. A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. 11380–11388, 1 dez. 2012.
- PENNACCHIA, C. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics.

- Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1919–1928, dez. 2008.
- PEROCCHI, F.; MANCERA, E.; STEINMETZ, L. M. Systematic screens for human disease genes, from yeast to human and back. **Molecular bioSystems**, v. 4, n. 1, p. 18–29, jan. 2008.
- PHADNIS, N. et al. Ntg1p, the base excision repair protein, generates mutagenic intermediates in yeast mitochondrial DNA. **DNA Repair**, v. 5, n. 7, p. 829–839, 2006.
- PHIEL, C. J. et al. Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734–36741, 28 set. 2001.
- PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 451, n. 1, p. 13–24, 2000.
- PUIG, S.; THIELE, D. J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. **Current opinion in chemical biology**, v. 6, n. 2, p. 171–80, abr. 2002.
- RADHAKRISHNAN, S. K.; JETTE, N.; LEES-MILLER, S. P. Non-homologous end joining: Emerging themes and unanswered questions. **DNA Repair**, v. 17, p. 2–8, maio 2014.
- RAJALAKSHMI, S.; KIRAN, M. S.; NAIR, B. U. DNA condensation by copper(II) complexes and their anti-proliferative effect on cancerous and normal fibroblast cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 393–406, 2014.
- RAMAKRISHNAN, S. et al. Induction of Cell Death by Ternary Copper (II) Complexes of L -Tyrosine and Diimines : Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity. **Inorganic chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1309–1322, 2009.
- ROGER, A. S. et al. **DNA Repair and Mutagenesis, Second Edition**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2006.
- SAITO, Y. et al. Premedication with intravenous magnesium has a protective effect against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 2, p. 481–487, 3 fev. 2017.
- SALE, J. E.; LEHMANN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 3, p. 141–52, 23 fev. 2012.
- SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 229–257, jun. 2008.
- SANTINI, C. et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 8 jan. 2014.
- SARIS, N. E. et al. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 294, n. 1–2, p. 1–26, abr. 2000.
- SCHNEIDER, K. et al. Metabolite profiling studies in *Saccharomyces cerevisiae*: an

- assisting tool to prioritize host targets for antiviral drug screening. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 12, 30 jan. 2009.
- SEIPLE, L. et al. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 140–151, 8 jan. 2006.
- SHIBASAKI, S.; MAEDA, H.; UEDA, M. Molecular display technology using yeast-arming technology. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 41–9, jan. 2009.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51- mediated recombination. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 404–407, 22 jan. 1998.
- SILVA, G. M.; FINLEY, D.; VOGEL, C. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 116–123, 26 jan. 2015.
- SILVA, P. P. et al. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 67–76, 2014.
- SINGH, K. K. et al. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* OGG1 DNA repair gene leads to an increased frequency of mitochondrial mutants. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 6, p. 1381–1388, 15 mar. 2001.
- SMITH, S. M. Valproic acid and HIV-1 latency: beyond the sound bite. **Retrovirology**, v. 2, p. 56, 19 set. 2005.
- SOMMER, D. et al. Partial reconstitution of DNA large loop repair with purified proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 14, p. 4699–4707, 27 jun. 2008.
- SPARKS, J. L. et al. **RNase H2-Initiated Ribonucleotide Excision Repair** *Molecular Cell*. [s.l.: s.n.].
- STOLZ, A. et al. Previously unknown role for the ubiquitin ligase Ubr1 in endoplasmic reticulum-associated protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 38, p. 15271–6, 17 set. 2013.
- SYLLA-IYARRETA VEITÍA, M. et al. Synthesis, structural analysis and anticonvulsant activity of a ternary Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1286–1293, out. 2009.
- SYMINGTON, L. S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 4, p. 630–70, table of contents, dez. 2002.
- TIAN, H. et al. DNA damage response – A double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 358, n. 1, p. 8–16, 1 mar. 2015.
- TKACH, J. M. et al. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 9, p. 966–976, 29 jul. 2012.
- TONG, G. M.; RUDE, R. K. Magnesium Deficiency in Critical Illness. **Journal of**

- Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 1, p. 3–17, 1 jan. 2005.
- TOUSSAINT, M.; CONCONI, A. High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1922–1928, nov. 2006.
- TROJNAR, M. K. et al. REVIEW NEW GENERATION OF VALPROIC ACID. **Polish Journal of Pharmacology Pol. J. Pharmacol**, v. 56, p. 283–288, 2004.
- TUREL, I. et al. Biological Activity of Some Magnesium(II) Complexes of Quinolones. **Metal-based drugs**, v. 7, n. 2, p. 101–4, 2000.
- UNK, I. et al. Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22427–34, 21 jul. 2000.
- VALENTE, A. X. C. N. et al. Functional organization of the yeast proteome by a yeast interactome map. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 5, p. 1490–5, 3 fev. 2009.
- VAN LINT, C.; EMILIANI, S.; VERDIN, E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. **Gene expression**, v. 5, n. 4–5, p. 245–53, 1996.
- VASCONCELLOS, M. C. et al. Genotoxicity of 15-deoxygoyazensolide in bacteria and yeast. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, n. 1, p. 16–25, 10 jul. 2007.
- VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 28, p. 1–9, dez. 2015.
- WATTS, F.; Z., F. Repair of DNA Double-Strand Breaks in Heterochromatin. **Biomolecules**, v. 6, n. 4, p. 47, 16 dez. 2016.
- WLODARCZYK, B. J. et al. Comparative teratogenicity analysis of valnoctamide, risperidone, and olanzapine in mice. **Bipolar disorders**, v. 17, n. 6, p. 615–25, set. 2015.
- WYRICK, J. J.; ROBERTS, S. A. Genomic approaches to DNA repair and mutagenesis. **DNA Repair**, v. 36, p. 146–155, dez. 2015.
- XU, X. et al. Error-free DNA-damage tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 764, p. 43–50, abr. 2015.
- YANG, K.; GUO, R.; XU, D. Non-homologous end joining: Advances and frontiers. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 7, p. 632–640, 2016.
- YLISASTIGUI, L. et al. Polyamides Reveal a Role for Repression in Latency within Resting T Cells of HIV- Infected Donors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 8, p. 1429–1437, 15 out. 2004.
- YUAN, F. et al. Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase eta. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 11, p. 8233–9, 17 mar. 2000.
- ZARIN, T.; MOSES, A. M. Insights into molecular evolution from yeast genomics. **Yeast**, v. 31, n. 7, p. 233–241, jul. 2014.

- ZEISE, M. L.; KASPAROW, S.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. **Valproate suppresses N-methyl-d-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro** *Brain Research*. [s.l: s.n.].
- ZHOU, X. Q. et al. Copper complexes based on chiral Schiff-base ligands: DNA/BSA binding ability, DNA cleavage activity, cytotoxicity and mechanism of apoptosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 244–256, 2016.
- ZHOU, Y.; PAULL, T. T. DNA-dependent protein kinase regulates DNA end resection in concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and ataxia telangiectasia-mutated (ATM). **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 52, p. 37112–25, 27 dez. 2013.
- ZHOU, Z. et al. UV induced ubiquitination of the yeast Rad4–Rad23 complex promotes survival by regulating cellular dNTP pools. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 15, p. 7360–7370, 3 set. 2015.
- ZIMMERMANN, F. K. et al. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 133, n. 3, p. 199–244, maio 1984.
- ZIMMERMANN, F. K.; VIG, B. K. Mutagen specificity in the induction of mitotic crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 139, n. 3, p. 255–68, 27 ago. 1975.

