

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Priscila dos Santos Silveira

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS
ENVOLVIDAS NA REPARAÇÃO DAS LESÕES NO DNA INDUZIDAS PELO
COMPLEXO ORGANOMETÁLICO VALPROATO DE COBRE 2,2 BIPYRIDINA EM
*Saccharomyces cerevisiae***

Porto Alegre

2019

Priscila dos Santos Silveira

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS
ENVOLVIDAS NA REPARAÇÃO DAS LESÕES NO DNA INDUZIDAS PELO
COMPLEXO ORGANOMETÁLICO VALPROATO DE COBRE 2,2 BIPIRIDINA EM
*Saccharomyces Cerevisiae***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Dr. Iuri Marques de Oliveira

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos Silveira, Priscila
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DAS
VIAS ENVOLVIDAS NA REPARAÇÃO DAS LESÕES NO DNA
INDUZIDAS PELO COMPLEXO ORGANOMETÁLICO VALPROATO DE
COBRE 2,2 BIPYRIDINA EM *Saccharomyces cerevisiae* /
Priscila dos Santos Silveira. -- 2019.
73 f.
Orientador: Dr. Iuri Marques de Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Ácido Valpróico. 2. complexo organometálico. 3.
cobre. 4. bipyridina. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I.
Marques de Oliveira, Dr. Iuri, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Priscila dos Santos Silveira

**AVALIACAO DA CITOTOXICIDADE E IDENTIFICACAO DAS VIAS
ENVOLVIDAS NA REPARACAO DAS LESOES NO DNA INDUZIDAS PELO
VALPROATO DE COBRE 2,2 BIPIRIDINA EM *Saccharomyces Cerevisiae***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 4 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kátia Valença Correia Leandro da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Beatriz Dal Pont Duarte
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Iuri Marques de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico esta monografia a minha vó Nair Rosa da Luz, a minha mãe Maria Aparecida dos Santos Silveira, ao meu pai Edeimar Bandeira Silveira e ao meu irmão Anderson dos Santos Silveira, pelo imenso apoio, confiança e pelo exemplo de pessoas que são. A “culpa” TODA é deles por eu ter conseguido entrar em uma universidade de excelência, de me manter dela, sem desistir e pelos incentivos diários.

Ao Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques, pela oportunidade de aprendizado em seu laboratório durante alguns anos, pelo contato com a pesquisa científica, em especial na área de genética toxicológica e pelo exemplo que és na ciência!!!

Ao Dr. Iuri Marques de Oliveira, por ter aceitado em me orientar neste projeto. Obrigada pelos ensinamentos, pelos muitos momentos de descontração, onde me via rindo em vez de chorar e por compartilhar sua experiência na ciência e na graduação. Obrigada por ter me ajudado no laboratório mesmo ainda não sendo meu orientador lá atrás, e pelo colega que és!

Ao meu colega querido Gabriel Berbigier Rodrigues, que é uma figura. Obrigada por me fazer rir muitas vezes em vez de chorar pelos experimentos que sempre davam errado hahaha. Te desejo tuuuuudo de bom e muito sucesso em sua caminhada.

Ao Cristiano Trindade, pelos ensinamentos, incentivos e aprendizados do qual levarei por toda minha caminhada. E ao André Juchem por me ensinar as técnicas.

Á Dra. Temenouga Guecheva (Nucha) pela oportunidade de aprender mais, pela paciência e confiança em mim de poder ajudar em outros projetos.

Aos meus colegas do laboratório de Reparação de DNA em eucariotos, em especial a Larissa Milano, Victória (vick) e Jéssica Pelegrini pela ajuda e pelo bom convívio e conversas. A Michelle, Grethel, Tati e Miriana pelos momentos de descontração quando dava tempo, quando não saía correndo para as aulas.

As minhas amigas que a tia UFRGS me deu, Jéssica Araújo, Caroline Gonçalves Vieira, Stefani Côrrea, Nathália Rammé e Laura Lago obrigada pelos ouvidos durante toda essa

caminhada, pelos choros e risadas. Sabemos bem o quanto foi difícil ao extremo chegar onde chegamos. Ao amigo querido Juliano Faccioni, Alexandra Nunes que dispensa comentários, és uma figura! E a minha prima Tairine pelo incentivo de sempre.

A minha amiga queridíssima de longa data Deisi Gastring pelos muitos momentos de incentivo em dizer que eu vou conseguir, mesmo eu pensando que não. Muito obrigada amiga pela pessoa que és!!!

As queridas Dras. Kátia Valença Correia Leandro da Silva e Beatriz Dal Pont Duarte em aceitar em fazer parte da minha banca.

E por fim, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo valioso ensino e oportunidade ao contato com a ciência, pois sem sombra de dúvida professores e técnicos administrativos me ajudaram e me instigam a ser uma profissional, uma cientista cada vez melhor.

Um Obrigada imenso e eterno!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ácido valpróico (AV)	1
1.2	Efeitos adversos e desenvolvimento de moléculas derivadas	4
1.3	Cobre.....	7
1.4	2,2'- bipyridina.....	8
1.5	Derivados organometálicos do NaValp contendo Cobre	10
2.	Modelo biológico: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.	Mecanismos de reparo de DNA	12
3.1	Reparo por excisão de bases (<i>Base Excision Repair</i> - BER).....	13
3.1.2	Reparo por excisão de nucleotídeos (<i>Nucleotide Excision Repair</i> -NER.....	13
3.1.3	Reparo por recombinação (<i>Homologous Repair</i> - HR).....	14
3.1.4	Reparo por recombinação não homóloga (<i>Non-homologous endjoining</i> , NHEJ).....	15
3.1.5	Reparo pós replicativo (<i>Post Replications Repair –PRR</i>) e Síntese de DNA Translesão (<i>Translesion Synthesis – TLS</i>).....	16
4.	OBJETIVOS	18
4.1.	Objetivo geral.....	18
4.1.2	Objetivos específicos.....	18
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	19
5.1	INTRODUCTION	22
5.2.	MATERIAL AND METHOD.....	24
5.2.1.	Chemicals	24
5.2.3.	Yeast growth conditions	24
5.2.4.	Cytotoxicity in yeast strains proficient and deficient in DNA repair	26
6.	RESULTS	26
6.1.	Organometallic complex valproate 2,2- bipyridine cytotoxicity in strains of the yeast <i>S. cerevisiae</i>	26
6.2.	Sensitivity of DNA repair-deficient yeast strains for NaValp and organometallic complex valproate 2,2- bipyridine.....	27
7.	DISCUSSION	31
8.	CONCLUSÕES	38
8.1	PERSPECTIVAS	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>Biochemical Pharmacology</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de ácido valpróico e valproato de sódio.....	2
Figura 2 – Estruturas químicas de diferentes isômeros de piridina.....	9
Figura 3 – Estruturas químicas do composto organometálico [Cu(Valp) ₂ Bipy].....	11

LISTA DE ABREVIATURAS

AV: Ácido Valproico

BER: *Base Excision Repair*. Reparação por Excisão de Bases

CPDs: Dímeros de Pirimidina Ciclobutano

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

GABA: *Gamma-AminoButyric Acid*. Ácido Gama-Aminobutírico

GGR: *Global Genome Repair*. Reparo Global do Genoma por NER

GSH: *Glutamylcysteine Synthetase*. Glutamilcisteína Sintetase

HDAC: *Histone Deacetylases*. Desacetilase de Histonas

HR: *Homologous Repair*. Reparação Homóloga

JH: *Holliday Junction*. Junção de Holliday

MRX: Complexo MRE11/RAD50/XRS2

NMDA: N-metil D-Aspartato

NER: *Nucleotide Excision Repair*. Reparação por Excisão de Nucleotídeos

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

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

PPs: Pirimidinas/Pirimidonas

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

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

Sítios AP: Sítiosapurínico/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

RESUMO

O Ácido Valpróico (AV) é um fármaco antiepiléptico amplamente utilizado na clínica, porém recentemente, apresentou interessantes atividades para terapia oncológica. Desta forma, sugere-se que os efeitos apresentados pelo fármaco, é devido a epigenética e capacidade de inibir a ação de histonas desacetilases (HDAC), resultando em estresse oxidativo, dano ao DNA, apoptose e inibição de vias envolvidas no reparo de DNA. Desta forma, moléculas que induzem dano ao DNA e/ ou inibição em vias de reparo de DNA, como o AV, possuem grandes chances de serem moléculas candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Entretanto, o AV possui limitações devido aos importantes efeitos adversos provocados por este fármaco. Por esta razão, os compostos organometálicos demonstram ser mais efetivos, em promover a redução de doses administradas e conseqüentemente a redução dos efeitos adversos. Desta forma, analisamos a citotoxicidade do complexo valproato de cobre 2,2 bipyridina [Cu(Valp)₂Bipy], e valproato de sódio (NaValp), 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*). Desta forma, analisando a curva de sobrevivência da linhagem selvagem (BY4741), o [Cu(Valp)₂Bipy] demonstrou ser mais citotóxico comparado com o NaValp. Os resultados indicam que as proteínas envolvidas nas vias de BER (*ogg1Δ*),NER (complexo Rad 1p- Rad10p) ou TLS (Rev1p, Rev3p, Rad30p), apresentaram maior sensibilidade ao NaValp. Além disso, os mutantes das vias BER (*mag1Δ*, *ogg1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ* e *ntg2Δ*),demonstraram maior sensibilidade ao [Cu(Valp)₂Bipy]. Os danos induzidos pelo [Cu(Valp)₂Bipy] podem ser reparados pelas proteínas envolvidas nas vias NER (Rad1p e Rad10), TLS (rev1p, rev3p, rad30p), PRR(Rad6 e Rad18p), HR (Rad52p) e NHEJ (Rad50p).Portanto, nossos resultados indicam que o complexo [Cu(Valp)₂Bipy] demonstrou aumento de citotoxicidade quando comparado ao NaValp, bem como promoveu diferentes lesões ao DNA, indicando assim como um potencial candidato ao desenvolvimento de agentes citotóxicos.

Palavras-chave: Ácido Valpróico, complexo organometálico, cobre, bipyridina, vias de reparo, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The valproic Acid (VA) has been largely used as anti-epilepsy drug and recently, as 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 inductor 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 effects. In this sense, organometallic complexes may be more effective and, consequently reducing the dose administered with the reduction of the side effects. In this context, we analyzed the cytotoxicity to copper 2,2-bipyridine valproate [Cu(Valp)₂Bipy] and sodium valproate (NaValp) 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 endjoining (NHEJ). Considering the cell survival assay in WT (BY4741) strain, [Cu(Valp)₂Bipy] was more cytotoxic than NaValp. The data indicated that deficient in BER (*ogg1p*), NER (complex Rad1p-Rad10p) or TLS (Rev1p, Rev3p and Rad30p) protein are associated with increased sensitivity to NaValp. The results also revealed that BER mutants (*mag1Δ*, *ogg1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ* and *ntg2Δ*) showed sensitivity to [Cu(Valp)₂Bipy]. DNA damage induced by [Cu(Valp)₂Bipy] can be repaired by NER (Rad1p and Rad10), TLS (rev1p, rev3p and rad30p), PRR (Rad6 and Rad18p), HR (Rad52p) e NHEJ (Rad50p) proteins. Therefore, our study reveals that [Cu(Valp)₂Bipy] complex have an enhanced cytotoxicity when compared to NaValp and induce distinct DNA lesions, indicating a potential application as cytotoxic agents.

Keywords: Valproic acid, organometallic complexes, copper, bipyridine, DNA repair, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. 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). Na fabricação de um fármaco, cerca de 250 de 100.000 moléculas são submetidas para fases clínicas I e II, e 5 mil entram em ensaios em humanos. Diante deste cenário, pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novas moléculas, tem ganhado espaço na indústria farmacêutica (VALERIE JEWELLS, 2014).

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 (KRAMER; SAGARTZ; MORRIS, 2007)

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, 2005).

1.1 Ácido valpróico

O Ácido Valpróico (AV, 2-propil-pentanoico, Fig 1) é um ácido carboxílico de cadeia curta ramificada, com estrutura química similar aos ácidos graxos e massa molecular de 144,214 g/mol. Esta molécula foi sintetizada pela primeira vez por Burton em 1882, como análoga ao ácido valérico presente na planta *Valeriana officinalis* (KOSTROUCH, 2007). Em 1962, o pesquisador Pierre Eynard da Universidade de Lyon na França, utilizou o AV como solvente de compostos com potencial anticonvulsivante com baixa solubilidade em meio aquoso. O AV é comumente utilizado na sua forma de sal, valproato de sódio (NaValp, Fig. 1), sendo há mais de 40 anos amplamente empregado na prática clínica para o tratamento de diversas formas de epilepsias parciais e generalizadas, como também no tratamento de transtornos psiquiátricos como bipolaridade, esquizofrenia, fobias sociais e dores neuropáticas (BALESTRINI; SISODIYA, 2018).

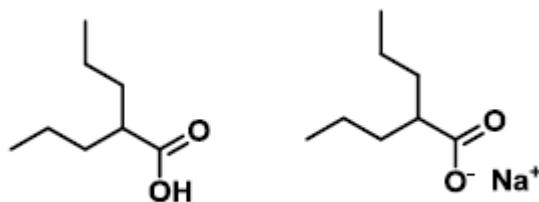


Figura 1. Estruturas químicas de ácido valpróico e valproato de sódio. (HREBACKOVA; HRABETA; ECKSCHLAGER, 2010)

Desde 1970, o AV tem sido administrado em diferentes apresentações (comprimidos, cápsulas gelatinosas, solução injetável e xarope), e comercializado como, Depakene® (US e Canadá), Convulex® (Sul da África), Depakote® e Micropakine® LP (Europa), Valpakine®, Valprin®, Depacon®, Epilenil® e Torval CR® (outros países).

Para o tratamento e prevenção de epilepsia o AV tem sido indicado desde 1937, para convulsões parciais (simples e complexa), generalizadas primárias (pequeno mal, grande mal e epilepsias mioclônicas), generalizadas secundárias (West, Lennox-Gastaut). E ao tratamento de transtorno bipolar, enxaquecas, esquizofrenia, depressão clínica e outras complicações neurológicas e neurodegenerativas, desde 1995 o AV tem sido aplicado na clínica. (CHATEAUVIEUX et al., 2007; VATZAKI et al., 2018)

O AV é administrado como monoterapia ou terapia adjuvante em associação a carbamazepina, topiramato, fenitoína e lamotrigina (NANAU; NEUMAN, 2013), com o objetivo de buscar um melhor efeito, em diferentes grupos de pacientes. O tempo de meia vida do AV, depende a quem é destinada sua administração. Para adultos o seu tempo de meia vida biológica é de 6 horas, crianças abaixo de 10 dias varia entre 10 a 67 horas, idade maior de 2 meses varia entre 6 a 15 horas. Na monoterapia, o tempo de meia vida varia entre 9 a 15 horas, em relação a concentrações contendo 100 a 250 mg de AV.

Pacientes adultos que realizam sua administração como monoterapia, 30- 50 % da dose administrada é observada na urina, na beta oxidação mitocondrial 40 % , menos que 15 a 20 % a eliminação ocorre em outras vias de oxidação e 3% em sua forma inalterada. (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015).

Um dos mecanismos de ação do AV em consiste aumentar o neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (Gamma-Amino Butyric Acid - GABA) no sistema nervoso central (SNC), e inibir as enzimas envolvidas metabolicamente com GABA, a saber: succinato semialdeído desidrogenase, succinato semialdeído redutase e GABA transaminase. Além disso, possui a

ação de mediar efeitos inibitórios em canais de sódio, modulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e bloqueio de canais de cálcio do tipo T e dependentes de voltagem (CHIU et al., 2013; EL; BAVEREL; MARTIN, 2012). Além disso, o NaValp pode exercer um efeito direto sobre os canais de potássio na membrana dos neurônios (CALABRESE et al., 2013; CHUANG et al., 2012; SILVA et al., 2008).

Diversos modelos celulares e *in vivo* de doenças neurodegenerativas sugerem que o NaValp exerce seus efeitos neuroprotetores modulando os níveis de acetilação de histonas via inibição de histona deacetilase (*histone deacetylase* - HDAC) e consequentemente o remodelamento da cromatina e a atividade expressão gênica das células neurais (CALABRESE et al., 2013; MARINOVA et al., 2011). Uma vez que a hipoacetilação das histonas é observado tanto nas doenças neurodegenerativas quanto nas lesões agudas do SNC (CHEN et al., 2014) a inibição das HDACs pelo NaValp se torna um aspecto relevante.

Além disso, o AV vem sendo também empregado no tratamento antitumoral. Sabe-se que os processos epigenéticos como a desacetilação de histonas e a metilação do DNA contribuem no desenvolvimento e progressão tumoral (DUENAS-GONZALEZ et al., 2008)

Neste sentido, estudos pré-clínicos indicam que o AV apresenta ação citotóxica sobre diversos tipos de câncer, entre eles gliomas, neuroblastomas, leucemias, câncer de próstata e mama (HREBACKOVA; HRABETA; ECKSCHLAGER, 2010) . Alguns dos mecanismos antiproliferativos do NaValp incluem a diferenciação na expressão de genes, diminuição da viabilidade e proliferação celular, parada do ciclo celular, apoptose, autofagia e senescência(CATTANEO et al., 2014; CHUANG et al., 2012; GU et al., 2012). Além disso, o uso combinado do valproato de sódio com outros compostos, como antitumorais, aumenta os seus efeitos na diminuição da viabilidade celular (DONG et al., 2007; SUGIMOTO et al., 2014). A descondensação da cromatina exercida pelo valproato de sódio, devido a sua ação como inibidor de HDACs, aumenta a eficácia de ligação de agentes genotóxicos como temozolamida, metotrexato e doxorubicina (JAFARY; AHMADIAN; SOLEIMANI, 2014; SAHA et al., 2017)

De uma forma geral, os mecanismos celulares do valproato de sódio são diversos, podendo agir de forma isolada ou sinérgica quando associado a outras terapias (KOSTROUCH, 2007). O valproato de sódio modula a regulação do ciclo celular, inibe a síntese de DNA, causa a supressão de vias de reparo de DNA, apoptose e alterações estruturais da cromatina via inibição de HDACs (MAKITA et al., 2015).

1.2 Efeitos adversos e desenvolvimento de moléculas derivadas

Todo o desenvolvimento de um medicamento tem como finalidade aumentar a expectativa de vida e eliminar alguma patologia. Entretanto, quando utilizado de forma abusiva, ou até mesmo de administração correta, prescritos a crianças de sexo feminino, mulheres em idade fértil e gestantes, os antiepilépticos, acabam por serem desencadeadores de reação adversa (RAM) e malformações. Desta forma, acabam aumentando os custos e a atenção ao setor de saúde e agências que realizam sua fiscalização e regulamentação, como a FDA (Food and Drug Administration) agência regulamentadora dos Estados Unidos, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), e no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999.(FERREIRA et al., 2009; VATZAKI et al., 2018)

Farmacologicamente, o valproato de sódio é a molécula ativa, a qual é convertida a ácido valpróico, originando íon de valproato, e metabolizado quase que totalmente no fígado. O AV, como todo o fármaco acaba sofrendo reação de fase 2, como a gluconidação, β -oxidação e metabolizado pelo complexo do citocromo p450, do qual dará origem a dois metabólicos hepatotóxicos, o 4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato.

Desta forma, a hepatotoxicidade é um dos mais comuns efeitos adversos, originada pelo aumento do nível de aminotransferase, apresentando microscopicamente, esteatose microvascular e macrovascular. Neste sentido, literatura também relata que o uso AV é limitado, e está relacionado em torno de 50% a efeitos adversos (NANAU; NEUMAN, 2013). Além disso, em nível primário há alterações gastrointestinais, tremores, perda de apetite (ILI, 2018). Em nível secundário há hiperamonemia, encefalopática, pancreatite, trombocitopenia, leucopenia e aumento de enzimas hepáticas(EMEKLI-ALTURFAN et al., 2015). A nível terciário, está relacionada a deformações do tubo neuronal em camundongos, formação de espinha bífida, interferência na formação do esqueleto axial, defeito urogenital e teratogênese em humanos e camundongos (GÜVELI et al., 2017; OKADA et al., 2004). Em casos de superdosagem o AV provoca, sonolência, bloqueio atrioventricular e coma (CHATEAUVIEUX et al., 2007).

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)

É bem estabelecido que um dos mecanismos de citotoxicidade associada à terapia com valproato de sódio é o estresse oxidativo (TABATABAEI; ABBOTT, 1999) sendo esse relacionado a um dos efeitos colaterais mais drásticos do valproato de sódio que é a teratogênese (DEFOORT; KIM; WINN, 2006). No primeiro trimestre gestacional o valproato de sódio induz um aumento de 10 a 20 vezes no risco de ocorrência de anomalias congênitas chamadas de Síndrome fetal do valproato, entre essas anomalias estão defeitos na formação do tubo neural, retardo de crescimento, dimorfismo facial, atraso no desenvolvimento cognitivo pós natal e autismo (DEFOORT; KIM; WINN, 2006; JENTINK, 2010)

Devido a estes efeitos adversos, fácil acessibilidade e baixo custo, o valproato de sódio tornou-se uma molécula interessante para a síntese de derivados que apresentem atividades farmacológicas similares ao valproato de sódio, mas, no entanto, com uma menor toxicidade. No caso da terapia antitumoral, compostos derivados do valproato de sódio são sintetizados com o objetivo de se conseguirem novas drogas antitumorais com uma menor toxicidade inespecífica, contra células tumorais, e um maior efeito antiproliferativo específico (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009)

O AV é uma molécula amplamente conhecida, de baixo custo, simples e capaz de interagir facilmente com diversas moléculas, proporcionando assim modificações em estruturas químicas. O AV tornou-se uma molécula molde e confiável para futuros compostos terapêuticos (BIALER; YAGEN, 2007).

Avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica de análogos do AV nos últimos anos em relação ao tratamento da epilepsia, foram observados resultados promissores, como melhor capacidade de penetração a barreira hematoencefálica, ação anticonvulsivante, baixa ação de teratogênese e ausência da formação de metabólitos tóxicos que desencadeiam a hepatotoxicidade (BIALER; YAGEN, 2007; OKADA et al., 2004).

Neste contexto, Neuman e colaboradores (2013) avaliaram os derivados valnoctamida e *sec-Butylpropylacetamide* do valproato de sódio em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e em linfócitos de pacientes que participaram de estudos clínicos com valproato de sódio e apresentaram efeitos adversos durante o estudo. Neste estudo, foi observado que os derivados do NaValp apresentaram menor citotoxicidade que o NaValp

nas células HepG2. O derivado *sec-Butylpropylacetamide* mostrou maior citotoxicidade para os linfócitos expostos a molécula. O NaValp e seus derivados aumentaram a liberação de interferon (IFN) γ e fator de necrose tumoral (TNF) α , entretanto, não mostraram influência na liberação de interleucina (IL) -1 ou IL-6. Aumentos significativos na liberação de IFN- γ e TNF- α foram observados em linfócitos expostos a altas doses de NaValp, e isso aumentou ainda mais com o tempo de exposição (NANAU; NEUMAN, 2013).

O mesmo composto *sec-Butylpropylacetamide* foi utilizado em outro estudo para avaliar dor neuropática e inflamatória aguda. Tendo em vista que a epilepsia e a dor neuropática partilham de mecanismos de ação subjacente semelhante, testaram o *sec-Butylpropylacetamide* em roedores, o derivado apresentou efeito superior ao apresentado pelo NaValp para dor inflamatória aguda e também para dor neuropática crônica (KAUFMANN et al., 2017). Com o objetivo de potencializar os efeitos angiogênico e anticâncer Farooq e colaboradores (2014)(FAROOQ et al., 2014), sintetizaram derivados de hidrazida-hidrazona valproilglicina de NaValp. Estes compostos suprimiram uma proporção significativa de vasos intersegmentares e a formação de veia sub-intestinal em todos os embriões de peixe-zebra tratados, afetaram o processo de diferenciação das células endoteliais e a formação de vasos sanguíneos. Em relação aos efeitos anticâncer, diminuíram a sobrevivência de células HepG2 em 60-80 % (FAROOQ et al., 2014).

Outra abordagem, é a associação de metais a moléculas orgânicas. Neste sentido, a química biológica de complexos metálicos já se mostrou de grande interesse para o desenvolvimento de novas drogas e atualmente é considerada como uma das mais promissoras áreas para desenvolvimento de novos quimioterápicos (HORN et al., 2013). Assim, Tabrizi e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade e atividade antimicrobiana de cinco derivados organometálicos do NaValp ($[\text{Cd}(\text{valp})_2(\text{imidazole})_2]$, $[\text{Cd}(\text{valp})_2(\text{phen})\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Co}(\text{valp})_2(\text{imidazole})_2]$, $[\text{Co}(\text{valp})_2(\text{phen})\text{H}_2\text{O}]$, e $[\text{Mn}(\text{valp})_2(\text{phen})\text{H}_2\text{O}]$). Os complexos apresentaram atividade significativa contra bactérias gram positivas e negativas. O NaValp não mostrou efeito antimicrobiano, mas os derivados organometálicos do NaValp apresentaram atividade moderada a alta quando comparados com o antibiótico Imipenem (TABRIZI et al., 2015).

Em relação ao magnésio, este metal também potencializa os efeitos farmacológicos de moléculas, resultados obtidos por Arce et al. (2007) em um estudo clínico de fase II avaliou se o valproato de magnésio poderia diminuir a resistência a quimioterapia de pacientes com tumores sólidos refratários de colo do útero, mama, pulmão, testículos e ovário. Os benefícios

clínicos foram observados em 80% dos pacientes, apresentaram redução na metilação do DNA e das acetilação de histonas (HORN et al., 2013)

Outro estudo de fase clínica I avaliou o efeito do valproato de magnésio na acetilação de histonas H3 e H4 e a atividade de HDAC em pacientes com tumor cervical, ocorreu a acetilação de ambas as histonas H3 e H4 e diminuição da atividade de HDAC em 80 % dos pacientes (HORN et al., 2013)

Há também os derivados organometálicos do NaValp contendo zinco. Os complexos organometálicos de NaValp e zinco $[Zn(Valp)_2Phen]$ e $[Zn(Valp)_2Bipy]$, foram avaliadas quanto à toxicidade embrionária e à atividade anticonvulsivante em modelo de zebrafish (*Danio rerio*). O complexo mais tóxico foi o $[Zn(Valp)_2Bipy]$ ($LC_{50}= 10\mu M$) na concentração de 30 mg/kg. O composto $[Zn(Valp)_2Phen]$ apresentou atividade anticonvulsivante superior, reduzindo as convulsões em aproximadamente 20 vezes em comparação a molécula protótipo NaValp na concentração de 175 mM/kg. Devido à sua menor toxicidade, o derivado $[Zn(Valp)_2Bipy]$ foi considerado o mais interessante para o uso clínico (GRÜNSPAN et al., 2018). Complexos organometálicos do NaValp com platina já foram sintetizados em um estudo conduzido por Griffith et al. (2011), mostrando um aumento na mutagênese e citotoxicidade em células de câncer de ovário (GRIFFITH, 2011). É importante se destacar que após a descoberta das propriedades antiproliferativas de compostos platinados, complexos de cobre também foram sendo estudados quanto ao seu potencial antitumoral, apresentando efeitos mais potentes e com menor toxicidade inespecífica do que seus análogos platinados (DUAN et al., 2018; WANG; GUO, 2006). A adição de ligantes doadores de nitrogênio, como fenantrolina, podem aumentar o efeito antitumoral de complexos de cobre (WANG; GUO, 2006).

1.3 Cobre

Para os organismos vivos, o cobre é um dos elementos traços essenciais ao funcionamento celular e manutenção da homeostase. O cobre possui participação na transferência de elétrons, incluindo diferentes oxidoredutases e apresenta atividade redox, a qual dará estímulo inespecífico para a oxidação lipídica e de proteínas.

A ausência ou excesso de cobre é deletéria ao organismo e o seu desequilíbrio é detectado através da resposta celular, em ajustar níveis de glutathione e recrutando genes envolvidos com a síntese da mesma. A deficiência de cobre leva ao desenvolvimento de manifestações patológicas como a anemia, por ser cofator de ferro ou outras desordens envolvidas em parte pela deficiência do mecanismo antioxidante. Além disso, o cobre pode ser

potencialmente tóxico, por conter a facilidade de alterar seu estado de oxidação para sua forma de íon livre (HATORI; LUTSENKO, 2013)

O cobre e outros metais, nos últimos anos tem despertado o interesse da área farmacêutica, com o foco da construção novas moléculas. Através de estudos, descobriu-se que complexos de cobre possuindo base heterociclíca ou seja, compostos que possuem em seu anel elementos que diferem de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, apresentam extensa e forte interação superficial ou intercalada com o DNA. Além disso, o cobre demonstrou potencial atividade para clivagem do DNA via mecanismo oxidativo e hidrolítico (QIAO et al., 2011).

Industrialmente, o cobre possui ação como agente antimicrobiano, contra a proliferação de microrganismos patogênicos, agente anti-inflamatório não esteroide e antitumoral. No caso da ação antitumoral, um estudo associou a ideia de criar novos compostos em conjunto a complexos de cobre, com a função de inibir a proliferação de células tumorais. Cadavid-Vargas e colaboradores (2018), analisaram o complexo cobre sulfametazina com 2,2' bipyridina na forma de esferas sílicas mesoporosas em células de osteosarcoma. Do qual observou-se que este complexo interfere seletivamente no mecanismo da divisão celular tumoral, como no dano ao DNA sem o reparo celular e após a mitose (CADAVID-VARGAS et al., 2018). Além disso, estas funções devem-se ao fato do cobre possuir potencial redox acessível. Desta forma, o cobre também possui afinidade para com o AV, do qual quando conjugado a íons de valproato produz complexos estáveis com maiores efeitos terapêuticos comparado aos compostos principais, não essenciais como a platina. (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009)

1.4 2,2'- bipyridina

A bipyridina (Bipy), ou também chamada de dipiridina, é definida como um dímero, derivado de seis diferentes isômeros (Fig. 2), sendo um deles a 2,2'- bipyridina. A bipyridina é um dímero pouco polar e insolúvel em água, devido ser constituída de pares de elétrons não ligantes com átomos de nitrogênio em anéis heteroaromáticos, e extremamente pesquisada desde o século XIX. (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Já a 2,2'- bipyridina, descoberta em 1889 pelo químico Fritz Blau, é um dímero, ligante neutro, sólido e cristalino, com peso molecular de 158,188g/mol. É obtida pela dimerização da piridina e um dos maiores dímeros com poder quelante já conhecido, devido sua estabilidade redox e simples funcionalização.(KAES; KATZ; HOSSEINI, 2000).

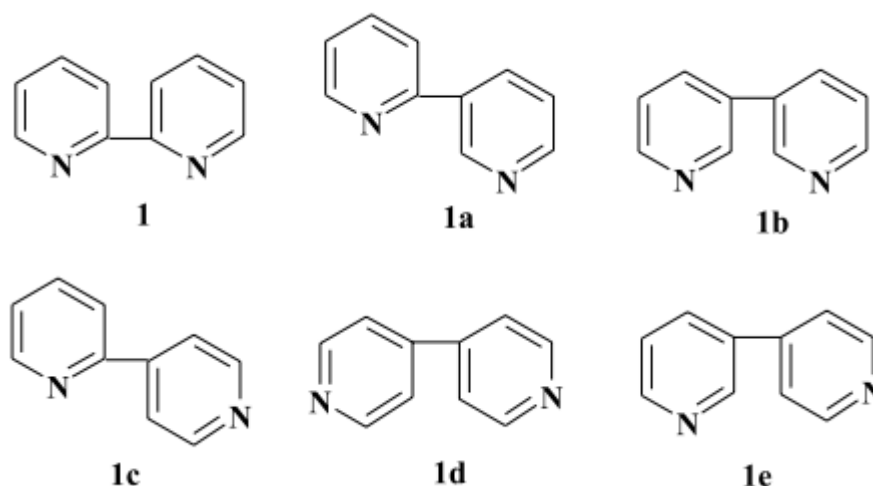


Figura 2. Estruturas químicas de diferentes isômeros de piridina: (1) 2,2'- bipyridina, (1a) 2,3'- bipyridina , (1b) 3,3'- bipyridina , (1c) 2,4'- bipyridina , (1d) 4,4'- bipyridina (1e) 3,4'- bipyridina.(VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004)

Em 1970, os cientistas começaram a inserir no cenário científico polímeros da 2,2'-bipyridina por esta demonstrar característica fotoquímica, a qual posteriormente vinham a ser aplicadas a conversão solar (SCHUBERT; ESCHBAUMER, 2002). Nos últimos anos, este dímero sozinho ou associado a 1,10 – fenantrolina (phen)(ROBERTO et al., 2015; STUMPF et al., 2018) e a outros ligantes nitrogenados, como cobre e sulfametazina(ÖZTÜRK; BULUT; BULUT, 2015), tem sido alvo para diversas abordagens científicas, uma destas reportadas com o intuito da sua utilização como ligante, para formação de novos complexos para fins terapêuticos, por exemplo na área oncológica. Através de estudos, esta molécula apresentou interação com o DNA e estabilidade a complexos metálicos. Esta estabilidade é promovida devido sua geometria ser constituída por duas moléculas justapostas não doadoras atômicas, constituindo uma conformação rígida e bidentada. Os ligantes aromáticos, também chamados de bidentados, interagem eletronicamente com metais centrais. (COORDENA; DUPLOS; QU, 2009)

Esta conformação, proporciona interação e estabilidade a complexos metálicos, propriedades cromáticas versáteis, levando a diversas aplicabilidades analíticas (STUMPF et al., 2018). Para esta molécula existem métodos que auxiliam sua obtenção, os três principais métodos são, (1) reações de acoplamento das piridinas, (2) reações de ciclização envolvendo seus precursores e (3) reações de substituição nucleofílicas em relação ao anel de piridina (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

1.5 Derivados organometálicos do NaValp contendo Cobre

Os complexos de cobre possuem uma longa história de aplicação medicinal. Além de ação antitumoral, complexos deste metal apresentam outras propriedades farmacológicas, como ação anti-inflamatória e anticonvulsivante, mais acentuadas do que as moléculas protótipo. Da mesma forma, a adição de ligantes, como 1,10-fenantrolina ou 2,2-bipiridina podem potencializar esses efeitos farmacológicos. Neste sentido, estudos utilizando o íon Cu^{2+} apresentaram efeito anticonvulsivante superior a molécula original do vaproato de sódio em modelos de epilepsia. O primeiro estudo foi conduzido por Sylla-Iyarreta Veitía e colaboradores (2009), utilizando o complexo $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, apresentou atividade anticonvulsivante consideravelmente superior a molécula protótipo valproato de sódio em modelo de epilepsia em ratos. O $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ mostrou uma atividade anticonvulsivante de início rápido e com efeito prolongado em doses que não causaram toxicidade aos animais expostos (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009).

O segundo estudo conduzido por Grünspan et al. (2018), utilizou a molécula $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, além da $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ (Fig. 3). Neste estudo foram avaliadas a toxicidade desses dois derivados organometálicos do valproato de sódio, em embriões de Zebrafish, bem como a atividade anticonvulsivante no mesmo modelo. O complexo mais tóxico foi o $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ com LC_{50} de $0,22 \mu\text{M}$ em 48 h e $0,12 \mu\text{M}$ em 96 h. O derivado $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$, na concentração de 10 mM/kg , apresentou atividade anticonvulsivante superior ao $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. Reduzindo as convulsões em aproximadamente 20 vezes, em comparação com a molécula protótipo NaValp, na concentração de 175 mM/kg (GRÜNSPAN et al., 2018).

Ainda neste mesmo sentido, deve-se ressaltar o estudo de GOLLA e colaboradores (GOLLA; JOSEPH; TOMAR, 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 do derivado $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ em relação à citotoxicidade e reparação de DNA do AV em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e deficientes nas principais vias de reparação de DNA, sendo realizada uma análise comparativa ao protótipo valproato de sódio.

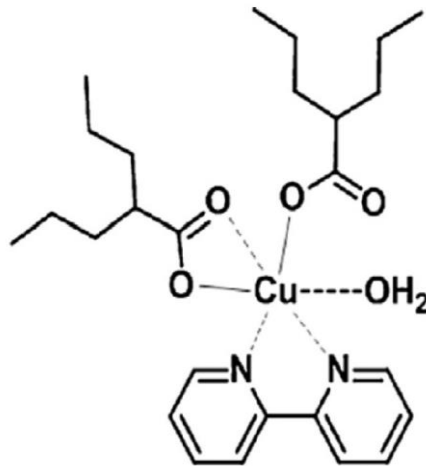


Figura 3. Estruturas químicas do composto organometálico [Cu(Valp)₂Bipy] utilizado neste estudo.

2. Modelo biológico: *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* é um fungo unicelular com ciclo eucariótico. É uma importante ferramenta na pesquisa biomédica, devido sua simplicidade, similaridade genética, bioquímica e fisiologia de mamíferos. Esse organismo mostrou-se ser um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas como, funcionamento de processos tumorais, pesquisas envolvendo a genética toxicológica e diversas patologias humanas (DUINA; MILLER; KEENEY, 2014; LAFON et al., 2007).

Além disso a levedura *S. cerevisiae* possui rápido crescimento e segurança. É geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA em pesquisas sobre mutagênese e reparação de DNA (ACEVEDO- TORRES, 2009; HERRERO, 2008). 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 (ZIMMERMANN; VIG, 1975).

3. Mecanismos de reparo de DNA

A todo o momento, o genoma celular encontra-se exposto a diferentes agentes exógenos e endógenos, que poderão ser os responsáveis pelo desencadeamento de lesões no DNA. As lesões podem causar disfunções celulares como a instabilidade genética, senescência alterações permanentes como morte celular e mutagênese.

Diante destas situações e dependendo de qual tipo de lesão gerada, mecanismos de reparo são recrutados para proteger a integridade de estruturas que compõe o DNA, pois uma vez danificado o DNA não poderá ser substituído. Um dos sistemas de reparo de DNA e o mais versátil deles, é o mecanismo de excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), o qual repara grandes lesões como distorção na estrutura de dupla hélice do DNA, além de reconhecer danos gerados pela luz UV, dímeros de DNA como ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e fotoprodutos (6-4) pirimidina-pirimidona (6-4 PPs). Para reparo de danos endógenos como alquilações, oxidações, depurinações e quebra na fita simples, o sistema de reparo de excisão de bases é recrutado (*Base Excision Repair*, BER).

Outro dano que o genoma celular acaba apresentando é a presença de quebras de cadeia dupla (*Double strand Breaks* -DSBs), a qual é extremamente prejudicial ao DNA, pois interfere na transcrição, replicação e divisão celular. A esta lesão o reparo por recombinação não homóloga (*Non-homologous endjoining*, NHEJ) é recrutado. O reparo por recombinação homóloga (*Homologous Repair*, HR) tem a finalidade em manter a estabilidade genômica, e repara a presença de cross-links DNA-proteína, quebra em fita dupla e lacunas (gaps) ocasionados pelo dano. Muitos dos danos desencadeados, por exemplo pela exposição a luz ultravioleta que originam dímeros de pirimidina, são removidos pelos sistemas de reparo NER por fotoreativação. Porém quando estes sistemas não conseguem vencer um tipo especial de sistema de reparo recombinacional acaba sendo recrutado, o chamado reparo pós replicativo (*Post Replications Repair* – PRR), que além de promover o reparo, auxilia na busca por melhores explicações sobre a coordenação do reparo, replicação de DNA e recombinação celular. Além disso, existe a síntese de translesão (*Translesion synthesis*), onde o dano consegue ser tolerado e a replicação consegue ser concluída.(CICCIA, A AND ELLEDGE, 2009; COSTA et al., 2003; DAVID; SHEA; KUNDU, 2010; ROBERTSON et al., 2009; ZEMAN; CIMPRICH, 2014).

3.1 Reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair- BER*)

Uma das primeiras e provavelmente a mais utilizada via de reparo de DNA, descoberta por Tomas Lindahl em 1974, é o reparo por excisão de bases, a qual preza pela integridade do genoma restaura a estrutura do DNA frente a diversos tipos de lesões. As lesões ocorridas ao DNA, derivam da incorporação incorreta de bases pela DNA polimerase resultando em bases modificadas e sítios abásicos, provenientes do estresse oxidativo, alquilações, depurinações e deaminações. A via BER em *S. cerevisiae*, inicia primeiramente pelo reconhecimento e remoção da base modificada por uma DNA glicosilase específica, dando origem a um sítio abásico (AP) (JACOBS; SCHÄR, 2012).

No sítio há uma ligação fosfodiéster que será clivada na fita 5' por uma AP endonuclease (Ntg1p, Ntg2p ou Ogg1p) seguida de Apn1p, gerando uma SSB, contendo em suas extremidades um resíduo hidroxil na região terminal 3' e uma desoxirribose fosfato na região terminal 5'. Logo após, a clivagem da região terminal 5' dRP, a lacuna formada pelo nucleotídeo excisado é preenchida por uma DNA polimerase livre de erro (Pol ξ) e as extremidades são reunidas pela ação da DNA-ligase (Cdc9p) (DIANOV; HÜBSCHER, 2013).

Além disso, sítio AP pode ser reparado por um de dois processos diferentes sendo denominados de Via curta (*Short-patch repair ou single-nucleotide BER*), responsável por incorporar somente um nucleotídeo, ou pela via longa (*Long-patch repair*), que incorpora de 2-8 nucleotídeos. Na via curta a DNA polimerase faz o processamento do intermediário gerado, como também a incorporação de um novo nucleotídeo e ligação da cadeia de DNA.

Entretanto, a via longa é considerada o principal local da proliferação celular, bem como o local do processamento de replicação para prosseguimento da atuação de APN1. Na via longa há atuação da endonuclease Rad27p responsável pela remoção de fragmentos de lesões após a síntese de DNA (KANAMITSU; IKEDA, 2010). Logo, a endonuclease Rad 27 (FEN - 1) acaba por remover o desemparelhamento e DNA ligase ou Cdc9, realiza a junção da região (JACOBS; SCHÄR, 2012; ROBERTSON et al., 2009).

3.1.2 Reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair -NER*)

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos, é uma via interessante por apresentar característica adaptativa e universal, frente a ação de diferentes danos na estrutura do DNA. Os principais danos exógenos reconhecidos pelo NER são gerados pela radiação ultravioleta (UV), a qual dará origem os dímeros de DNA ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e fotoprodutos (6-4) pirimidina-pirimidona (6-4PPS)(ROCHA et al., 2016).

O reparo de NER é crucial para que o funcionamento do DNA seja reestabelecido, pois os danos que afetam o DNA, acabam dando origem a grandes distorções na estrutura dupla hélice. Estas lesões acabam interferindo no pareamento de pares de bases, bem como interrompendo as fases de transcrição e duplicação celular (COSTA et al., 2003).

O mecanismo de reparo pelo NER em especial o reparo do genoma global (GG-NER), é o responsável em reconhecer lesões no genoma como um todo pela proteína Rad4 (MAZOUZI et al., 2017). Este inicia-se com o reconhecimento da localização da lesão executado pelo complexo Rad4p-Rad23p-Rad33p e Rad7p-Rad16p que também remove um fragmento de DNA, produzindo DNA de cadeia simples (*ssDNA – single strand DNA*). Logo após, TFIIH, Rad4 e RPA são recrutados para formar um complexo pré-incisão, que verifica a lesão. As endonucleases Rad1p-Rad10p e Rad2p agem para incisar as regiões 5' e 3' da lesão, onde um oligonucleótido contendo lesão é liberado. Logo, as DNA polimerases realizam o preenchimento da lacuna, associado aos fatores de replicação (Cdc9, RFC e PCNA). Uma nova síntese de DNA é realizado para o uso como um molde e por fim ocorre a ligação da região 5' da fita nova pela DNA ligase(BOITEUX; JINKS-ROBERTSON, 2013).

Somado a este processo, NER é composto por mais uma subvia, o reparo acoplado a transcrição (TC-NER), relacionado ao reconhecimento da lesão pelo bloqueio da transcrição(MAZOUZI et al., 2017). Ambas as subvias (TC-NER) e (GG-NER) se diferem em relação ao tipo de lesão.

3.1.3 Reparo por recombinação (*Homologous Repair- HR*)

A compreensão do funcionamento do mecanismo de reparo por recombinação homóloga em mamíferos, deve-se as pesquisas envolvendo modelos biológicos de *S. cerevisiae*, frente as lesões ocasionadas pela radiação ionizante (GAO et al., 2016). Da qual cedeu a oportunidade de identificação de proteínas essenciais para esta via, como a Rad52p e sua interação com outras proteínas como Rad50, Rad51, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59 e Mre11, pertencendo ao grupo de epistasia Rad52 (MORTENSEN et al., 2002; STEIN; KALIFA; SIA, 2015).

A recombinação homóloga é considerada como um mecanismo de troca complexa e importante para assegurar tanto a integridade genética, apresentada na forma das cromátides irmãs de fases S e G2 do ciclo celular, bem como promover a estabilidade do genoma como todo. A HR é recrutada para reparar ou tolerar danos ao DNA, por outro lado pode levar a presença de rearranjos cromossômicos (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010). Como por exemplo, o surgimento das quebras de cadeia dupla ("*double strand breaks*" ou DSB), a qual ocasionará

a má funcionalidade da fase de transcrição do DNA e da maturação do sistema imune (PANDITA, 2011). Esta via de reparo utiliza uma cópia cromossomal (“3’-single stranded DNA” ou ssDNA), não só para reparar quebras de cadeia dupla, mas impede que a forquilha de replicação encontre quebras da cadeia do DNA desfeitas pelo seu caminho, *crosslinks* e problemas na funcionalidade da enzima topoisomerase II, ou seja, é uma via dependente de um molde e um reparo livre de erros (BARKER; POWELL, 2010; KOWALCZYKOWSKI, 2015; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018). O mecanismo de HR em leveduras inicia-se com o reconhecimento de DSB, ligação do complexo MRX formados pelas proteínas Mre11/Rad50/Xrs2, seguido pela remoção de extremidades 5’ nas DSBs pelas nucleases, gerando caudas de DNA fita simples (3’DNA) para cada segmento lesionado. Após a esta etapa ocorre um processo bem característico desta via, que é a invasão da fita de DNA com a união de 3’-ssDNA, Rad 51p e Rad52p no duplex de DNA homólogo para o reparo. Desta fase há origem do D-loop, que é mediado pelas Rad51p e Rad52p. O D-loop formado promove a síntese de um substrato para a ligação da proteína de replicação A (RPA) e o reestabelecimento da informação genética (LOK; POWELL, 2012; STARK et al., 2004)

Logo após a este processo há outras abordagens alternativas, a primeira é a síntese dependente do anelamento de cadeia (*Synthesis-Dependent Strand Annealing - SDSA*), a *D-loop* se dissocia, e a cadeia invasora se reanela á segunda extremidade produzida pelo reparo, sem troca e sem recombinações cruzadas. E a segunda é a reparação de quebras duplas do DNA (*Double-Strand Break Repair*), a qual neste processo a cadeia deslocada da *D-loop* pode anelar com a segunda extremidade da DSB, formando junções de Holliday (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010).

3.1.4 Reparo por recombinação não homóloga (*Non-homologous endjoining*, NHEJ)

A recombinação não homóloga (NHEJ) é uma via de reparo altamente dinâmica e um dos principais mecanismos ao reparo de danos resultantes da radiação ionizante (SISHC; DAVIS, 2017). Durante seu processo pode ocorrer a perda de nucleotídeos. Desta forma, é uma via propensa a erros, e não depende de uma cópia cromossomal, para o início do seu processo (ANTHONY J. DAVIS AND DAVID J. CHEN, 2013; BÉTERMIER; BERTRAND; LOPEZ, 2014). É responsável também em reparar quebras de cadeia dupla do DNA, em todas as etapas do ciclo celular, mas preferencialmente em fases G1 e S, entretanto, a recombinação homóloga (HR) repara especificamente quebras duplas durante as fases 2 e S que correspondem de 15% a 20%, comparado a atuação de NHEJ. Esta escolha de atuação não ocorre aleatoriamente, é definida pelo controle de fatores de ressecção (GAO et al., 2016; YANG; GUO; XU, 2016).

Como todas vias, a NHEJ recruta proteínas importantes para a execução de seu reparo, em *S. cerevisiae* é a proteína Hdf1 compostas pelas subunidades Hdf1 e Hdf2 que compreendem yKu70 e yKu80 (CERVELLI; GALLI, 2000), são responsáveis em ligar às extremidades do DNA onde está a lesão, recrutando a subunidade catalítica cinase dependente de DNA (complexo DNA-PKcs) e Rad50p ao sítio da lesão. Em seguida há presença de uma lacuna que será preenchida pela Rad27p e Pol4p. A ligação das extremidades é feita pela DNA ligase Dnl4p associada com a proteína Lif1 (MLADENOV; ILIAKIS, 2011)

3.1.5 Reparo pós replicativo (*Post Replications Repair – PRR*) e síntese de translesão (*Translesion Synthesis – TLS*)

Muitos danos ocorridos no DNA como a luz UV e radiação ionizante, acabam promovendo o bloqueio da forquilha de replicação. Uma alternativa e uma forma preventiva para a conservação do genoma, é o reparo pós replicativo (DOE; WHITBY, 2004; KATS et al., 2009). O PRR é definido como um mecanismo com a função de reestabelecer duplas fitas do DNA que obtiveram sua arquitetura alterada devido a presença de lesões (GAO et al., 2017). É coordenado pelas enzimas Rad 6p, Rad 18p, ambas dependentes da ubiquinização de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). O PCNA contém a função em ativar o mecanismo de PRR, devido estar associada a síntese e a reparação do DNA (PHUOC T et al., 2019). E Rev1p em *S. cerevisiae*, demonstrou controlar a fase G2 do ciclo celular (WATERS; WALKER, 2006). A via PRR acaba utilizando dois mecanismos ao reparo, o primeiro é um mecanismo escape (*by-pass*) em prol da prevenção a danos no DNA, ao qual sugere-se que há utilização da cromátide-irmã não danificada como um molde de replicação (JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; WIND, 2015) e segundo é a via síntese de DNA translesão (TLS), mecanismo livre de erros, a qual há incorporação de nucleotídeos corretos ao lado do dano, com auxílio das DNA polimerases em *S. cerevisiae*, eta (Rev3 e Rev7) e zeta (Rad30), esta última quando mutada contribui para o surgimento de hipersensibilidade a UV (SALE, 2013).

Quando a forquilha de replicação se encontra interrompida pela presença de danos, as helicases continuam o processo de desenrolar a dupla hélice. Logo, estas enzimas se dissociam da forquilha de replicação ainda inativa, trechos de *ssDNAs* são formados. Estes trechos serão os responsáveis em recrutar a proteína Rad18 associado a Rad6 no sítio da lesão (GAO et al., 2017). Associado a estes processos proteínas A acabam em ativar pontos de checagem de replicação e esta é executada (GAO et al., 2017). Logo após, o PCNA inicia o PRR recrutando polimerases da via TLS para que a reparação seja iniciada (BRET et al., 2010).

A síntese de translesão (TLS), é um mecanismo mutagênico e tolerante a danos. É constituído pelas polimerases Rev1p (*Rev1* – “Reversão menor”), Pol *zeta* passível de erro e Rad30p, Pol *eta* livre de erros, as quais são responsáveis pela inserção de nucleotídeo no lado oposto à base lesada, ultrapassando a lesão e reiniciando a replicação (DURANDO; TATEISHI; VAZIRI, 2013; GAN et al., 2008), Rev3 e Rev7 são proteínas acessórias (JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; WIND, 2015). As polimerases da TLS, quando participam da reação de replicação acabam inserindo nucleotídeos inapropriados, que podem levar ao surgimento de mutações e patologias mais severas, além de interferir no processo de reparo das vias BER e NHEJ (JANSEN; TSAALBI-SHTYLIK; WIND, 2015; SALE, 2013). Entretanto, em alguns casos a presença de mutações pode ser benéfica pois podem ceder a oportunidade da adaptação das células em ambientes estressantes, ou seja, a evolução de espécies (DE PADULA et al., 2004; KATS et al., 2009; PUTNAM; HAYES; KOLODNER, 2010).

Em um estudo realizado por Yamanaka et al (2017), envolvendo o uso de quimioterápicos para a análise da ação da TLS em adenocarcinomas pancreáticos, câncer de pulmão e malignidades do sistema nervoso central (SNC), observou-se que a função by-pass da TLS associado a mutações de DNA polimerases promoveu a resistência intrínseca de drogas, bem como a tolerância de danos ao DNA. Além disso, a TLS apresentou efeito dualístico quando sua atividade propensa a erros está ou não mais expressada (YAMANAKA et al., 2017).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo investigar o efeito biológico do complexo Valproato de Cobre com 2,2' Bipyridina (Bipy) - $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ em relação à citotoxicidade e reparação de DNA em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do composto $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ em linhagens de *S. cerevisiae* pelo teste de sobrevivência quantitativo.
- Verificar a influência do composto $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ 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.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Revista científica: **Biochemical Pharmacology**

Título: INVESTIGATION OF CITOTOXICITY AND DNA REPAIR PATHWAYS INVOLVED IN REPAIR OF LESIONS INDUCED BY Cu(II) COMPLEX BASED ON VALPROIC ACID WITH 2,2 -BIPYRIDINE IN *Saccharomyces cerevisiae*

INVESTIGATION OF CITOTOXICITY AND DNA REPAIR PATHWAYS INVOLVED IN REPAIR OF LESIONS INDUCED BY Cu(II) COMPLEX BASED ON VALPROIC ACID WITH 2,2 -BIPYRIDINE IN *Saccharomyces cerevisiae*

Priscila dos Santos Silveira¹, Gabriel Berbigier Rodrigues¹, Sidnei Moura², João Antônio Pêgas Henriques¹, Iuri Marques de Oliveira¹

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

² Laboratory of Natural and Synthetics Products, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.

* Corresponding author

Dr. Iuri Marques de Oliveira

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: iurimarquesdeoliveira@gmail.com

ABSTRACT

The valproic Acid (VA) has been largely used as anti-epilepsy drug and recently, as 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 inductor 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 effects. In this sense, organometallic complexes may be more effective and, consequently reducing the dose administered with the reduction of the side effects. In this context, we analyzed the cytotoxicity to copper 2,2-bipyridine valproate [Cu(Valp)₂Bipy] and sodium valproate (NaValp) 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 endjoining (NHEJ). Considering the cell survival assay in WT (BY4741) strain, [Cu(Valp)₂Bipy] was more cytotoxic than NaValp. The data indicated that deficient in BER (*ogg1p*), NER (complex Rad1p-Rad10p) or TLS (Rev1p, Rev3p and Rad30p) protein are associated with increased sensitivity to NaValp. The results also revealed that BER mutants (*mag1Δ*, *ogg1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ*, *ntg1Δ* and *ntg2Δ*) showed sensitivity to [Cu(Valp)₂Bipy]. DNA damage induced by [Cu(Valp)₂Bipy] can be repaired by NER (Rad1p and Rad10), TLS (*rev1p*, *rev3p* and *rad30p*), PRR (Rad6 and Rad18p), HR (Rad52p) e NHEJ (Rad50p) proteins. Therefore, our study reveals that [Cu(Valp)₂Bipy] complex have an enhanced cytotoxicity when compared to NaValp and induce distinct DNA lesions, indicating a potential application as cytotoxic agents.

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

5.1 INTRODUCTION

Valproic Acid (AV, 2-propyl-pentanoic) is a short chain carboxylic acid with a chemical structure similar to fatty acids. It is used in the clinic for treatment and prevention of epilepsy, seizures and generalized, treatment of bipolar disorders, migraines, schizophrenia, withdrawal clinic and other neurological and neurodegenerative complications [1]. Among the main anti-epileptic intervention mechanisms of AV, it includes action on the gamma-aminobutyric acid neurotransmitter [2]. AV also plays a role in the modulation of N-methyl D-Aspartate (NMDA) receptors and in the blocking of T-type and voltage-dependent calcium channels [3].

In recent years, it has also been used in antitumor treatment. Preclinical studies indicate that AV presents cytotoxic action on several types of cancer, including gliomas, neuroblastomas, leukemias, prostate and breast cancer [4]. In this sense, an important property of AV that has been extensively studied is the action on chromatin structure. It has recently been found that AV acts on the inhibition of histone deacetylases (HDAC) by modifying chromatin structure and gene expression in different cell types, such as astrocytes and neurons [5]. Importantly, the influence of AV on HDAC enzymes has also been identified in different types of tumors in vitro and in vivo, a property that is being suggested as the main mechanism of action involved in AV antitumor activity [2] [4]. Because of its properties of inhibition of HDAC and consequently the expression of several genes, AV can interfere in important pathways of cellular activity, such as cell cycle control, differentiation, DNA repair, apoptosis and senescence [2] [4] [6].

The use of AV in the treatment of epilepsy or even in antitumor therapy has some limitations because of the important adverse effects caused by this drug. The most common adverse reactions to AV include hepatotoxicity, mitochondrial toxicity, encephalopathy, hypersensitivity syndrome, neurological, metabolic, endocrine and teratogenic manifestations [9]. However, although with a low incidence, these reactions can lead to serious and potentially fatal consequences, having a huge impact on clinical practice and public health. For this reason, there is a great interest in the development of derived molecules that present pharmacological activities similar to AV and, nevertheless, with lower toxicity and/or greater pharmacological effect.

The importance given by the coordination compounds to biological functions makes it a relevant option to use metals for the structural modification of known drug molecules. Therefore, molecules with chemical properties favorable to the formation of complexes can be modified in order to potentiate its effect and, consequently, to reduce the dose administered

with the reduction of the side effects. Thus, in the case of antitumor therapy, compounds derived from AV are synthesized in order to achieve new antitumor drugs with less non-specific toxicity against normal cells, and a greater specific antiproliferative. In this sense, the AV-conjugated platinum (IV) complex diamminichlorodihydroxiplatin complex showed 50 to 100 fold more cytotoxicity compared to the original compound against various types of human carcinoma cell lines and showed inhibitory effects on the growth of xenographic lung carcinoma (A549) in vivo with low systemic toxicity [7]. The Zn (II) complex containing phenanthroline and 2,2'-bipyridine with VA showed higher cytotoxicity than VA in *Artemia salina* [8]

The copper ions produce stable complexes with valproate ions that had much higher therapeutic effects than parent compound. In this sense, the organometallic copper valproate complex with 1,10-phenanthroline increased the anticonvulsant activity of AV in 3000x in murine models of epilepsy, without altering the toxicity of the prototype molecule [9].

In addition, tested embryo toxicity and the anticonvulsant of 4 model metallodrugs, derivate of valproic acid and the N-donor ligand in adult zebrafish. In this study, the most toxic complex was [Cu (Valp)₂Bipy] with IC₅₀ of 0.22 μM in 48 h, followed [Zn(Valp)₂Bipy] with IC₅₀ of 10 μM. The same derivate [Cu (Valp)₂Bipy] 10 mM/kg and [Zn(Valp)₂Bipy] 30 mM/100kg was shown to increase activity with reducing the seizure intensity around 20 times compared with sodium valproate 175 mM/kg [10].

Molecules that induce DNA damage and/or induce inhibition of pathways related to the repair mechanism become candidates for the development of antitumor agents [11]. In this context, the AV showed silencing pathways and inactivating proteins related to the repair mechanism, inducing the formation of reactive oxygen species (ROS) and double strand breaks (DSBs) Makita et.al, showed that the AV showed a synergistic potential for the inhibition of double strand breaks repair pathways by the acetylation of p53 of the DSBs signaling cascade and Ku70 at the non-homologous final junction (NHEJ), as well as suppressed expression levels of Rad51 in homologous recombination (HR) and inhibited pathways such as HR and NHEJ related to the mechanism of repair by the DSB process in squamous cell carcinoma [12][13]. GOLLA et al. (2016) show that VA induced changes in expression of genes in yeast related DNA repair pathways such as base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) and NHEJ [14].

In this sense, since it is not clear how the Na Valp and [Cu(Valp)₂Bipy], influence in 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. In addition, Grazziotin et al., 2005 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. Moreover, yeast cells can be easily genetically manipulated and mutants for specific biochemical pathways can be generated rapidly [15][16]. In this work we will present the VA and derivate [Cu(Valp)₂Bipy] sensitivity of single, double, triple and quadruple mutants that are blocked in different mechanisms of DNA repair pathways. 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.

5.2. MATERIAL AND METHOD

5.2.1. Chemicals

Sodium valproate (NaValp) 98% was purchased from AK Scientific (Union City, CA, USA). [Cu(Valp)₂Bipy] was provided by Dr Sidnei Moura, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil. 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.

5.2.2. 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. (BURKE et al., 2000). 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. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar.

Table 1

Strains	Relevant genotypes	DNA repair pathway affected	Source
BY4741 (WT)	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; 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 apn2::kanMX</i>	BER	R Medina-Silva
SJR751 (WT)	<i>MATα; ade2-101_{oc}; his3Δ200; ura3ΔNco; lys2ΔBgl; 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 apn1::HIS3</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad1::hisG</i>	BER/NER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad52::URA3</i>	BER/HR	RL Swanson*
XV185-14C	<i>MATα; ade2-2; arg4-17; his1-7; lys1-1; trp5-48; hom3-10</i>	-	R.C Von Borstel

* Swanson *et al.* (1999)

5.2.3. 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.

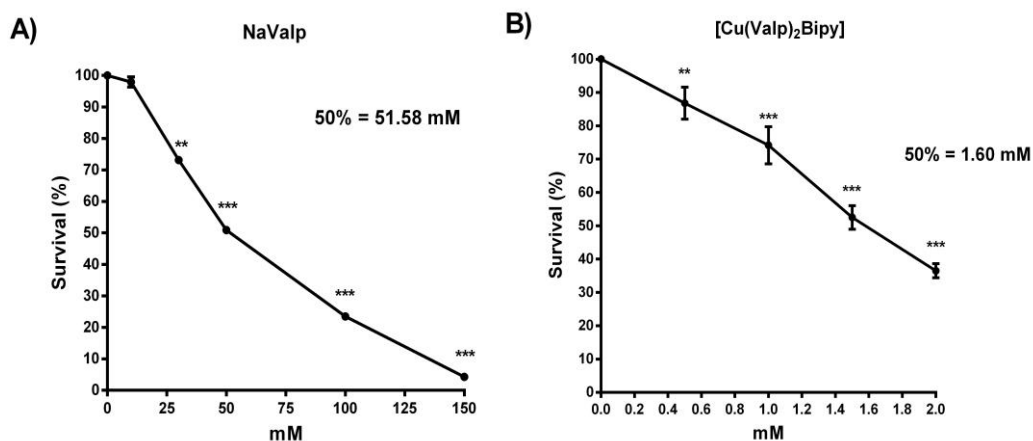
5.2.4. Cytotoxicity in yeast strains proficient and deficient in DNA repair.

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; the [Cu(Valp)₂Bipy] concentrations employed were 0, 5 and 7 mM. All assays were performed at least twice with each dose in triplicate.

6. RESULTS

6.1. Organometallic complex valproate 2,2- bipyridine cytotoxicity 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. In relation to [Cu(Valp)₂Bipy] complex was observed 50% reduction in yeast survival at least 1.60 mM (Fig. 2B). The [Cu(Valp)₂Bipy] showed cytotoxicity at least ~32 times higher than NaValp.



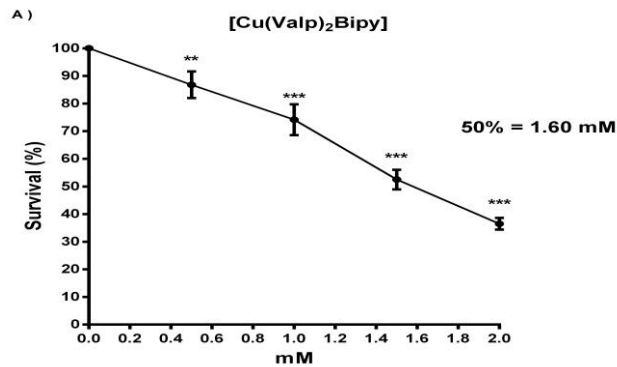


Fig. 1. Sensitivity of WT yeast strain (BY4741) in growth conditions to VA and organometallic complex exposure: (A) Na Valp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. Cells were treated for 24 h at 30°C. The data represent an average of three independent experiments. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

6.2. Sensitivity of DNA repair-deficient yeast strains for NaValp and organometallic complex valproate 2,2- bipyridine

In order to evaluate the interaction of DNA repair pathways in response to VA or organometallic complex -induced DNA damage, we also performed survival assays to compare the sensitivities of single, double 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 *ogg1* Δ displayed increased cytotoxicity to NaValp exposure when compared to the isogenic BY4741 WT strain (Fig. 2A). The strains defective for Apn1p, Rad27p, Ntg1p, Ntg2p and Mag1p have similar WT-sensitivity to the same NaValp treatment (Fig. 2A). However, the single- *mag1* Δ , *ogg1* Δ , *rad27* Δ , *apn1* Δ , *ntg1* Δ , double- *apn1* Δ *apn2* Δ , *ntg1* Δ , *ntg2* Δ mutants, showed higher sensitivity than WT to [Cu(Valp)₂Bipy] treatment, while *apn2* Δ strain have similar WT-sensitivity to complex exposure treatment (Fig. 2 B).

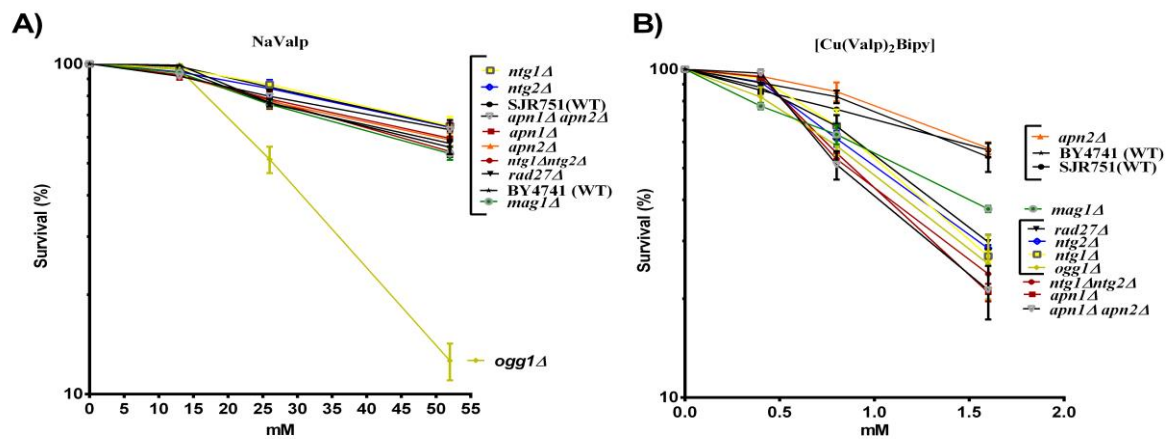


Fig. 2. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in BER proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. The survival of parental strains (BY4741 and SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ogg1, Ntg1, Ntg2, Rad27 and Mag1. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

The *rad1Δ* and *rad10Δ* strains, which lack the 5'- and 3'- endonucleases of NER, displayed a moderate sensitivity to NaValp (Fig. 3A) and [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 3B)[23]. In contrast, mutants *rad4Δ* and *rad14Δ* (proteins that recognizes and binds damaged DNA during NER) [24], had the same sensitivity as the WT after exposure to VA and [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 3A and 3B respectively).

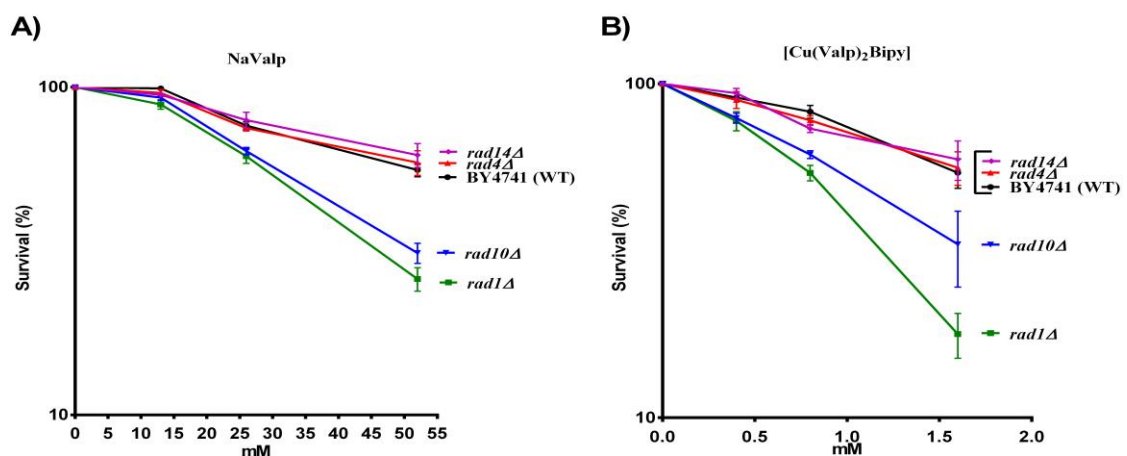


Fig. 3. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in NER proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that

of variants defective for the NER proteins Rad1, Rad10, Rad4 and Rad14. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

The *rev3 Δ* , *rev1 Δ* and *rad30 Δ* strains deficient in TLS proteins showed higher sensitivity to NaValp exposure in relation to WT (Fig. 4A). In contrast, the strains *rev1 Δ* and *rev3 Δ* showed less sensitivity when compared to the WT strain for [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 4B). However, *rad30 Δ* strain was more sensitive to VA than [Cu(Valp)₂Bipy](Fig. 4A and 4B respectively). The PPR deficient strains *rad6 Δ* and *rad18 Δ* and showed more sensitivity when compared to the WT after NaValp or [Cu(Valp)₂Bipy] exposure (Fig. 4A).

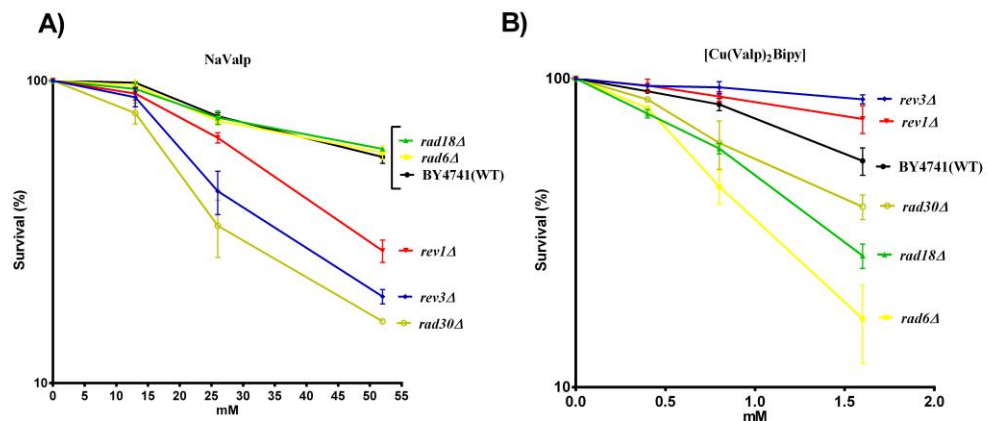


Fig.4. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in TLS or PRR proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the TLS proteins Rev1, Rev3 and Rad30 or PRR proteins Rad6 and Rad18. Data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

The mutant strains *rad52 Δ* (HR pathway) and *rad50 Δ* (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. 5A). However, the recombination-deficient *rad52 Δ* and *rad50 Δ* showed the higher sensitivity in relation to isogenic WT strain to organometallic complex (Fig. 5B).

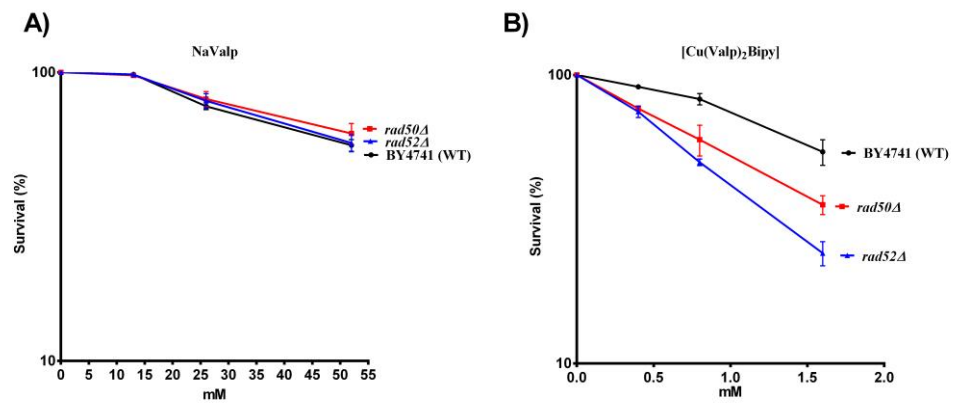


Fig. 5. Survival of *S. cerevisiae* strains mutants deficient in HR or NHEJ proteins after treatment with: (A) NaValp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. The survival of parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the HR protein Rad52 or NHEJ protein Rad50. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

In order to evaluate the interaction of DNA repair pathways in response to NaValp or organometallic complex -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. 6A). However, the single *ntg1Δntg2Δapn1Δ* and quadruple *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* mutants showed the same sensitivity as the WT (Fig. 6 A).

The quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* was less sensitivity to [Cu(Valp)₂Bipy] than quadruple *ntg1Δntg2Δapn1Δ rad* mutant (Fig. 6B). The quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and triple *ntg1Δntg2Δapn1Δ* mutant was more sensitivity to [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 6B). It is important to note that the triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* was more sensitive than the single mutants to copper complex treatment.

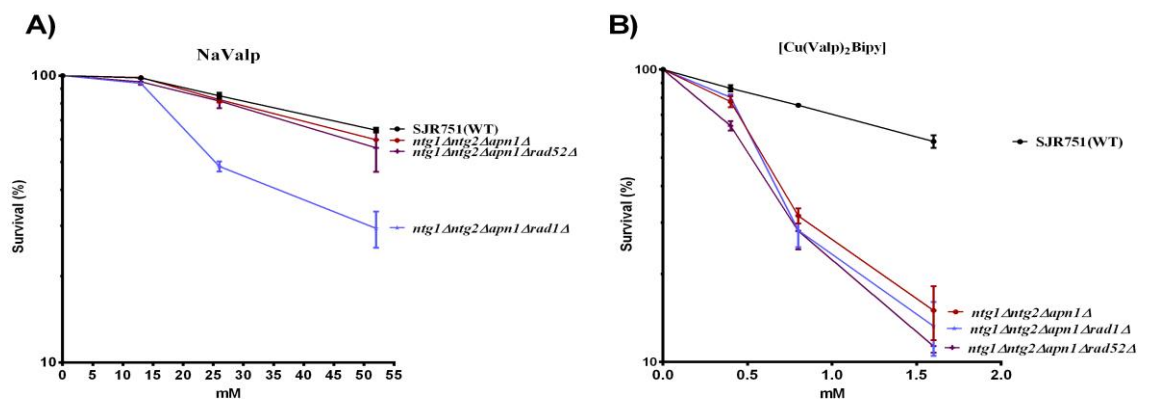


Fig. 6. Survival of *S. cerevisiae* quadruple mutant strains deficient in BER, HR and NER after treatment with A) NaValp, (B) [Cu(Valp)₂Bipy]. The survival of the parental strain (SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2, the NER protein Rad1 and the HR protein Rad52. Data are expressed as mean \pm SD, n=4.

7. DISCUSSION

In this study, we analyzed Organometallic complex valproate of copper 2,2- bipyridine [Cu(Valp)₂Bipy] in relation to its cytotoxicity and DNA repair. Experimental data from our laboratory shows that [Cu(Valp)₂Bipy] complex can interact with DNA promoting its cleavage in vitro indicating a potential role as chemotherapeutic agents. Thus, in order to elucidate the biological properties of [Cu(Valp)₂Bipy], we evaluated the response of strains proficient or defective in DNA repair 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 [17] 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. [18] 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). The [Cu(Valp)₂Bipy] complex were more cytotoxic than the Na Valp, the prototype molecule to yeast cells. In this context, several copper complexes have strong cytotoxic effects in different cell type [19][20].

The cellular effects of VA appear to be very complex, but in part linked to its ability to disturb cellular redox homeostasis [21]. Really, Mitsui et al. found that ROS accumulated in yeast cells treated with 25 mM VA after 20 h of incubation [18]. 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) [22]. 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 [22]. In this sense, the Rad1p-Rad10 complex is important for removing 3' dirty ends generated during BER [22]. In fact, our results indicate that the NER-deficient strains *rad1Δ* and *rad10Δ* have sensitivity to NaValp (Fig. 3A). 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. 6A). 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 [22]. 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) [23][24][25] showed sensitivity to NaValp exposure (Fig. 4A). The *rad30Δ* strain was more sensitive to NaValp than *rev1Δ* and *rev3Δ* (Fig. 4A). These data suggest that possibly Rad30p preferentially act on the tolerance to damage induced by the NaValp in relation to Rev1p and Rev3p. Interestingly, deficiencies in the PRR, HR and NHEJ pathway did not influence on the sensitivity to NaValp treatment (Fig. 4A and 5A).

In relation to [Cu(Valp)₂Bipy] complex induced decrease in survival of strains deficient in BER proteins (mag1p, Ntg1p, Ntg2p, Ogg1p, Rad27p and Apn1p) except for Apn2p (Fig. 3B). Apn1p, Ntg1p and Ntg2p are important proteins of the BER pathway: Apn1p is the major apurinic/apyrimidinic (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[36]. 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 [26]. Mag1p initiates BER of DNA alkylation damage by removing 3-MeA and other alkylated purines [25]. In addition, double and triple mutant *ntg1Δntg2Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δ* mutants were sensitive to [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 6B) 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 [27][28]. For example, the [Cu(Phen)₂]²⁺ complex was able to induce oxidative damage in DNA [29]. In this sense, the interaction between BER and NER for oxidative DNA damage

processing also seems to be true for [Cu(Valp)₂Bipy] exposure, once that *rad1Δ* and *rad10Δ* strains showed higher sensitivity than WT (Fig. 3B) and quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* was more sensitive than triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 6B). 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 [30]. Restart of stalled forks can occur through a recombination-associated pathway or mutagenic TLS [22]. The *rad30Δ* strain was weakly more sensitive than WT to [Cu(Valp)₂Bipy] exposure (Fig. 4B). Interestingly, the strains defective for Rev1p and Rev3p showed resistance to organometallic complexes treatment in relation to the WT (Fig. 4B).

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. Moreover, the sensitivity of the *rad52Δ* mutant [Cu(Valp)₂Bipy] (Fig. 5B) suggests that HR is important for the processing of genetic lesions induced by organometallic complexes. In addition, after treatment with [Cu(Valp)₂Bipy], the quadruple mutant for BER and HR (*ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*) showed the higher sensitivity than *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Fig. 6B). These data suggest an interaction of different DNA repair pathways related to tolerance of damage induced by [Cu(Valp)₂Bipy]. 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 [31]. 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 [32]. Therefore, if not repaired, the DSBs can lead to cell death [31]. Moreover, we observed enhanced sensitivity in *rad50Δ* strain deficient in subunit of the MRX complex (Fig. 5B), which, in addition to its role in the HR, is also involved in DSBs processing by the NHEJ pathway in an error-prone manner [33]. Interestingly, various copper(II) ternary complexes showed strong DNA interactions and remarkable capability to cleave DNA [29][33][34]. The [Cu(Valp)₂Bipy] complex also interact with DNA in vitro and display cleavage activities [35].

Besides the DNA cleavage potential, the possible interaction of $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ with DNA also can generate stalled replication fork, generating a signal that recruits proteins of HR or TLS pathways. Alternatively, PRR could be involved in processing the DNA lesions induced by organometallic complex that were not removed during replication.

Taken together, the copper (II) with Bipy 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] 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>
- [2] 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
- [3] Zeise, M. L.; Kasparow, S.; Zielgansberger, W. Valproate suppresses N-methyl-d-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro *Brain Research*
- [4] 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
- [5] Marinova, Z. et al. Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons.
- [6] Huang, B. H. et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21^{Cip1}/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death and Differentiation*, v. 12, n. 4, p. 395–404, 21 abr. 2005
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Grunspan, L. D. et al. Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebra fish. v. 139, n. December 2017, p. 171–179, 2018
- [11] C. Santini, M. Pellei, 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
- [12] 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
- [13] 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

- [14] 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
- [15] 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.
- [16] L. Guintini, R. Charton, F. Peyresaubes, 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
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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).
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] E. Enernald, 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.
- [26] 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.
- [27] 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.

- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] K. Hanamshet, O. Mazina, A. Mazin, Reappearance from Obscurity: Mammalian Rad52 in Homologous Recombination, *Genes (Basel)*. 7 (2016) 63. doi:10.3390/genes7090063.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Claus T. PICH, P. R. D. S., Tatiana V. O. Fortunato, Marilda Chiarello, et al. Mixed Ternary Mononuclear Copper(II) Complexes Based on Valproic Acid with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands: DNA Interaction and Cytotoxicity in V79 Cells. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. Vol. 00, No. 00, 1-17, 2019.
- [36] 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.

8. CONCLUSÕES

Conclusão geral

O presente estudo mostrou que o complexo organometálico- [Cu(Valp)₂Bipy] é mais citotóxico comparado ao AV em *S. cerevisiae* e as lesões no DNA induzidas por esta molécula e seu derivado 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 e o ligante 2,2-bipiridina.

Conclusões específicas

- O complexo [Cu(Valp)₂Bipy] apresentou maior citotoxicidade do que o valproato de sódio.
- valproato de sódio induz a formação de lesões no DNA reparadas pelas vias BER, NER e TLS.
- complexo [Cu(Valp)₂Bipy] induziu a formação de lesões no DNA que levam ao recrutamento das vias BER, NER, TLS e PRR.

8.1 PERSPECTIVAS

Com intuito de contribuir para melhor compreensão do mecanismo de ação do complexo organometálico [Cu(Valp)₂Bipy] em *S. cerevisiae*.

- Avaliar possíveis mutações do composto, através das substituições de pares de bases, identificadas pela frequência de mutação nos loci *hom 3*, *his1* e *lys1* da linhagem XV185-14C
- Investigar a participação de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina.
- Avaliar a capacidade de necrose e apoptose do composto organometálico em células de mamíferos através da avaliação do ciclo celular.
- Verificar, em levedura, a participação da indução de estresse oxidativo na citotoxicidade do valproato de sódio e [Cu(Valp)₂Bipy] 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.

REFERÊNCIAS

- 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, 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, 2009.
- ANTHONY J. DAVIS AND DAVID J. CHEN. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. **NIH Public Access**, 2013.
- BALESTRINI, S.; SISODIYA, S. M. Pharmacogenomics in epilepsy. **Neuroscience Letters**, v. 667, p. 27–39, 2018.
- 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, abr. 2014.
- BARKER, C. A.; POWELL, S. N. Enhancing radiotherapy through a greater understanding of homologous recombination. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 20, n. 4, p. 267- 273.e3, 2010.
- BÉTERMIER, M.; BERTRAND, P.; LOPEZ, B. S. Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.
- BIALER, M.; YAGEN, B. Valproic Acid: Second Generation. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 130–137, 2007.
- BOITEUX, S.; GUILLET, M. Abasic sites in DNA : repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair**, v. 3, 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. 1025–64, 2013.
- BORTOLOTTI, T.; PICH, C. T.; TEREZI, H. Tunable DNA cleavage activity promoted by copper(ii) ternary complexes with N-donor heterocyclic ligands. **Chemical Communications**, p. 12–15, 2016.
- BRAVO-GÓMEZ, L. R.-A. AND M. E. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, p. 3606–3615, 2010.
- BRET D. FREUDENTHAL, LOKESH GAKHAR, S. RAMASWAMY, AND M. T. W. Structure of

Monoubiquitinated PCNA and Implications for Translesion Synthesis and DNA Polymerase Exchange. *v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2010.*

BURKE, D. et al. **Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual.** 2000 ed. ed. Plainview, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

CADAVID-VARGAS, J. et al. Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytoand Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, *v. 17, n. 3, p. 424–433, fev. 2017.*

CADAVID-VARGAS, J. F. et al. Copper complex with sulfamethazine and 2,2'-bipyridine supported on mesoporous silica microspheres improves its antitumor action toward human osteosarcoma cells: cyto- and genotoxic effects. **BioMetals**, *v. 0123456789, 2018.*

CALABRESE, F. et al. Modulation of neuronal plasticity following chronic concomitant administration of the novel antipsychotic lurasidone with the mood stabilizer valproic acid. **HHS Public Access**, *v. 226, n. 1, p. 101–112, 2013.*

CATTANEO, M. et al. Down-modulation of SEL1L, an unfolded protein response and endoplasmic reticulum-associated degradation protein, sensitizes glioma stem cells to the cytotoxic effect of valproic acid. **Journal of Biological Chemistry**, *v. 289, n. 5, p. 2826–2838, 2014.*

CERVELLI, T.; GALLI, A. Effects of HDF1 (Ku70) and HDF2 (Ku80) on spontaneous and DNA damage-induced intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, *v. 264, n. 1–2, p. 56–63, 2000.*

CHALISSERY, A. J. et al. Repair of Oxidative DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair**, 2016.

CHATEAUVIEUX, S. et al. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, *v. 2007, p. 1–18, 2007.*

CHEN, S. et al. Valproic Acid: A New Candidate of Therapeutic Application for the Acute Central Nervous System Injuries. **Neurochemical Research**, *v. 39, n. 9, p. 1621–1633, 2014.*

CHIU, C. et al. Therapeutic Potential of Mood Stabilizers Lithium and Valproic Acid : Beyond Bipolar Disorder. **Epilepsy Research**, *n. January, p. 105–142, 2013.*

CHUANG, C. M. et al. Valproic Acid Downregulates RBP4 and Elicits Hypervitaminosis A-Teratogenesis-A Kinetic Analysis on Retinol/Retinoic Acid Homeostatic System. **PLoS ONE**, *v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012.*

- CICCIA, A AND ELLEDGE, S. . The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, 2009.
- COORDENA, A. O. S. C. D. E.; DUPLOS, S.; QU, E. **QUÍMICA INORGÂNICA I – Química de Coordenação**. [s.l: s.n.].
- COSTA, R. M. A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083–1099, 2003.
- DAVID, S. S.; SHEA, V. L. O.; KUNDU, S. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 2010.
- DE PADULA, M. et al. The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 17, p. 5003–5010, 2004.
- DEFOORT, E. N.; KIM, P. M.; WINN, L. M. Valproic Acid Increases Conservative Homologous Recombination Frequency and Reactive Oxygen Species Formation : A Potential Mechanism for Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects. **MOLECULAR PHARMACOLOGY**, v. 69, n. 4, p. 1304–1310, 2006.
- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 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.
- DOE, C. L.; WHITBY, M. C. The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1480–1491, 2004.
- DONG, X. F. et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in KM3 cells via down regulating VEGF receptor. **Neuroendocrinology Letters**, v. 28, n. 6, p. 775–780, 2007.
- DUAN, H. Y. et al. Disruption of planar cell polarity pathway attributable to valproic acid-induced congenital heart disease through Hdac3 participation in mice. **Chinese Medical Journal**, v. 131, n. 17, p. 2080–2088, 2018.
- 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, 2008.
- DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on

the *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 2014.

DURANDO, M.; TATEISHI, S.; VAZIRI, C. A non-catalytic role of DNA polymerase γ in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 5, p. 3079–3093, 2013.

EL, M.; BAVEREL, G.; MARTIN, G. Effects of valproate on glutamate metabolism in rat brain slices : A ^{13}C NMR study. **Epilepsy Research**, v. 99, n. 1–2, p. 94–100, 2012.

EMEKLI-ALTURFAN, E. et al. Effects of Edaravone on Cardiac Damage in Valproic Acid Induced Toxicity. v. 45, n. 2, p. 166–172, 2015.

ENERVALD, E. et al. Importance of Pol η for damage-induced cohesion reveals differential regulation of cohesion establishment at the break site and genome-wide. **PLoS genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003158, jan. 2013.

FAROOQ, M. et al. Biological Screening of Novel Derivatives of Valproic Acid for Anticancer and Antiangiogenic Properties. v. 15, p. 7785–7792, 2014.

FERREIRA, F. G. et al. FÁRMACOS : Do desenvolvimento á retirada do Mercado. Drugs : from development to withdrawal. v. VI, n. 1, p. 14–24, 2009.

FRANCOIS, L. G. R. C.; CONCONI, P. F. T. A. Nucleosome positioning, nucleotide excision repair and photoreactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Elsevier B.V.**, 2015.

GAN, G. N. et al. DNA polymerase zeta (pol ζ) in higher eukaryotes. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 174–183, 2008.

GAO, S. et al. The non-homologous end-joining pathway of *S. cerevisiae* works effectively in G1-phase cells, and religates cognate ends correctly and non-randomly. **DNA Repair**, v. 42, p. 1–10, 2016.

GAO, Y. et al. Mechanisms of post-replication DNA repair. **Genes**, v. 8, n. 2, 2017.

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. June, p. 1–16, 2016.

GRAZZIOTIN, D. et al. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 59–69, 2005.

GRIFFITH, D. M. Novel trans -platinum complexes of the histone deacetylase inhibitor valproic acid ;

synthesis , in vitro cytotoxicity and mutagenicity. v. 105, p. 793–799, 2011.

GRÜNSPAN, L. D. et al. Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebra fish. v. 139, n. December 2017, p. 171–179, 2018.

GU, S. et al. Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. **Anti-Cancer Drugs**, v. 23, n. 10, p. 1054–1066, 2012.

GÜVELI, B. T. et al. Teratogenicity of antiepileptic drugs. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 19–27, 2017.

HANAMSHET, K.; MAZINA, O.; MAZIN, A. Reappearance from Obscurity: Mammalian Rad52 in Homologous Recombination. **Genes**, v. 7, n. 9, p. 63, set. 2016.

HATORI, Y.; LUTSENKO, S. An Expanding Range of Functions for the Copper Chaperone/Antioxidant Protein Atox1. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 945–957, 2013.

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, 2008.

HEYER, W.D.; et al. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 113–139, 2010.

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.

HORN, A. et al. Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 128, p. 38–47, 2013.

HREBACKOVA, J. et al, T. Valproic Acid in the Complex Therapy of Malignant Tumors. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 361–379, 2010.

ILI, V. et al, Association between Adverse Effects and Parental Beliefs about Antiepileptic Medicines. **MDPI**, 2018.

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. **Chromosoma**, v. 121, n. 1, p. 1–20, 2012.

JAFARY, H.; AHMADIAN, S.; SOLEIMANI, M. The enhanced apoptosis and antiproliferative response to combined treatment with valproate and nicotinamide in MCF-7 breast cancer cells. **Tumor**

Biology, v. 35, n. 3, p. 2701–2710, 2014.

JENTINK, J. et al. Valproic Acid Monotherapy in Pregnancy and Major Congenital Malformations. **The new england journal of medicine**, p. 2185–2193, 2010.

JANSEN, J. G.; TSAALBI-SHTYLIK, A.; WIND, N. DE. Roles of mutagenic translesion synthesis in mammalian genome stability, health and disease. **DNA Repair**, p. 1–9, 2015.

KAES, C. et al. Bipyridine: The most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2,2'-bipyridine units. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 10, p. 3553–3590, 2000.

KANAMITSU, K.; IKEDA, S. Early Steps in the DNA Base Excision Repair Pathway of a Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 1–9, 2010.

KATS, E. S. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Rad6 Postreplication Repair and Siz1/Srs2 Homologous Recombination-Inhibiting Pathways Process DNA Damage That Arises in *asf1* Mutants. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 19, p. 5226–5237, 2009.

KAUFMANN, D. et al. sec-Butylpropylacetamide (SPD), a new amide derivative of valproic acid for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 129–139, 2017.

KOSTROUCH, Z. Valproic Acid, a Molecular Lead to Multiple Regulatory Pathways. **Folia Biologica (Praha)**, v. 49, p. 37–49, 2007.

KOWALCZYKOWSKI, S. C. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, p. 1–36, 2015.

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.

LAFON, A. et al. MYST opportunities for growth control: Yeast genes illuminate human cancer gene functions. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5373–5384, 2007.

LIMPOSE, K. et al. BERing the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management. **DNA Repair**, v. 56, p. 51–64, ago. 2017.

LIU, Y. et al. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 589–615, jun. 2004.

LOK, B. et al. Molecular pathways: Understanding the role of Rad52 in homologous recombination

for therapeutic advancement. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 23, p. 6400–6406, 2012.

LV, J. et al. The Antiepileptic Drug Valproic Acid Restores T Cell Homeostasis and Ameliorates Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 28656–28665, ago. 2012.

MAKAROVA, A. et al. 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, 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**, p. 1185–1192, 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, 2011.

MAZOUZI, A. et al. Repair of UV-Induced DNA Damage Independent of Nucleotide Excision Repair Is Masked by MUTYH. **Molecular Cell**, v. 68, n. 4, p. 797- 807.e7, 2017.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. Valproato de Sódio. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.

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, 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, 2011.

MORTENSEN, U. H. et al. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 20, p. 10729–10734, 2002.

MUKHERJEE, N. et al. Targeted photocytotoxicity by copper(II) complexes having vitamin B6 and photoactive acridine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. Ii, 2016.

MUTOH, NORIHIRO, S. KITAJIMA. 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, 2011.

NANAU, R. M.; NEUMAN, M. G. Adverse drug reactions induced by valproic acid. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 1323–1338, 2013.

NICKOLOFF, J. A. Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, jul. 2017.

OKADA, A. et al. Amidic Modification of Valproic Acid Reduces Skeletal Teratogenicity in Mice. v. 53, n. January, p. 47–53, 2004.

ÖZTÜRK, F.; BULUT, I.; BULUT, A. Structural, spectroscopic, magnetic and electrochemical studies of monomer N-substituted-sulfanilamide copper (II) complex with 2,2'-bipyridine. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, n. Ii, p. 891–899, 2015.

PANDITA, S. et al. The Cellular Control of DNA Double-Strand Breaks. **J Cell Biochem**, v. 185, n. 2, p. 974–981, 2011.

PHUOC T. TRAN, et al. Mutation in EXO1 defines separable roles in DNA mismatch repair and post-replication repair. **DNA repair**, v. 6, p. 1572–1583, 2019.

PICH, C. T. et al. Mixed Ternary Mononuclear Copper(II) Complexes Based on Valproic Acid with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands: DNA Interaction and Cytotoxicity in V79 Cells. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 30, n. 3, p. 597–613, 2019.

PUTNAM, C. D. et al. Post-Replication Repair Suppresses Duplication-Mediated Genome Instability. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, 2010.

QIAO, X. et al. Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 728–737, 2011.

ROBERTO, P. et al. Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn (II) complex containing 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine with valproic acid. **Polyhedron**, v. 90, p. 239–244, 2015.

ROBERTSON, A. B. et al. Base excision repair: The long and short of it. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 981–993, 2009.

ROCHA, J. C. et al. Role of nucleotide excision repair proteins in response to DNA damage induced by topoisomerase II inhibitors. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 768, p. 68–77, 2016.

SAHA, S. K. et al. Valproic acid induces endocytosis-mediated doxorubicin internalization and shows synergistic cytotoxic effects in hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 18, n. 5, 2017.

SALE, J. E. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2013.

SAN FILIPPO, J. et al. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 229–257, jun. 2008.

SCHUBERT, U. S. et al. Macromolecules Containing Bipyridine and Terpyridine Metal Complexes : Towards Metallosupramolecular Polymers. p. 2892–2926, 2002.

SILVA, M. F. B. et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 31, n. 2, p. 205–216, 2008.

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper (II) with Tetracycline or Doxycycline and 1, 10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral : Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic chemistry**, n. li, p. 6414–6424, 2011.

SISHC, B. et al. The role of the core non-homologous end joining factors in carcinogenesis and cancer. **Cancers**, v. 9, n. 7, 2017.

STARK, J. M. et al. Genetic Steps of Mammalian Homologous Repair with Distinct Mutagenic Consequences. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9305–9316, 2004.

STEIN, A. et al. Members of the RAD52 Epistasis Group Contribute to Mitochondrial Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2015.

STUMPF, T. et al. Synthesis and Characterization of Heterometallic Iron – Uranium Complexes with a Bidentate N - Donor Ligand (2, 2' -Bipyridine or. 2018.

SUGIMOTO, K. et al. Valproic acid enhances the anti-tumor effect of pegylated interferon- α towards pancreatic cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 34, n. 7, p. 3403–3409, 2014.

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, 2009.

TABATABAEI, A. et al. Assessing the Mechanism of Metabolism-Dependent Valproic Acid-Induced in Vitro Cytotoxicity †. **Chem. Res. Toxicol**, p. 323–330, 1999.

TABRIZI, L. et al. Synthesis, crystal structure, spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of cadmium(II), cobalt(II) and manganese(II) valproate with 1,10-phenanthroline and

imidazole. **INORGANICA CHIMICA ACTA**, n. li, 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. 966–76, 2012.

VALERIE JEWELLS, H. W. S. Review of Epilepsy - Etiology, Diagnostic Evaluation and Treatment. **International Journal of Neurorehabilitation**, v. 01, n. 03, p. 1–8, 2014.

VATZAKI, E. et al. Latest clinical recommendations on valproate use for migraine prophylaxis in women of childbearing age: Overview from European Medicines Agency and European Headache Federation. **Journal of Headache and Pain**, v. 19, n. 1, p. 4–9, 2018.

VIDOTTI, E. C. et al. E. Divulgação. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.

WANG, T. et al. Copper in Medicine : Homeostasis , Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. n. I, p. 525–537, 2006.

WATERS, L. S. et al. The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G₂ M phase rather than S phase. **PNAS**, v. 103, n. 24, p. 8971–8976, 2006.

WLODARCZYK et al. Comparative teratogenicity analysis of valnoctamide , risperidone , and olanzapine in mice. **Bipolar Disorders**, p. 615–625, 2015.

WRIGHT, W. D. et al. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524–10535, 2018.

YAMANAKA, K. et al. Inhibition of mutagenic translesion synthesis : A possible strategy for improving chemotherapy ? **PLoS Genetics**, p. 1–16, 2017.

YANG, K. et al. Non-homologous end joining: Advances and frontiers. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 7, p. 632–640, 2016.

ZEMAN, M. K. et al. Causes and consequences of replication stress. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 2–9, 2014.

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, set. 2015.

ZIMMERMANN, F. K. et al. Mutagen specificity in the induction of mitotic crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 139, n. 3, p. 255–268, 1975.

ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Revista: Biochemical Pharmacology

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Biochemical Pharmacology is an international peer reviewed journal devoted to publishing original research and invited reviews and commentaries on the interaction of chemical compounds with biological systems. Manuscripts describing experiments conducted with chemical mixtures, plant or animal extracts will not be considered for publication unless the chemical structures and precise concentrations of all substances are reported.

While particular emphasis is placed on reporting findings that relate to pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism of both small molecules and biologics at the biochemical and molecular levels, submissions in the areas of behavioral and physiological pharmacology and toxicology are considered if they describe studies directed at defining mechanisms of action. All areas related to the field of pharmacology are represented in the journal including, but not limited to, chemotherapy, neuropharmacology, inflammation/immunopharmacology, antimicrobials, behavioral, respiratory, gastrointestinal, cardiovascular and endocrine pharmacology and toxicology.

Reports describing de novo results of clinical studies and those that predominately or exclusively concern database mining and analysis and computational methodologies, e.g. CAMD, are outside the scope of the journal.

Types of papers

(1) Full-length Research Papers. Biochemical Pharmacology publishes original research on issues of relevance to the field of pharmacology.

(2) Reviews and Commentaries. These articles are by invitation only and provide the authors' views on a selected topic of interest to pharmacologists. Manuscript preparation and submission Provided below is detailed information on the scientific criteria and manuscript formatting required for an article to be considered for publication in Biochemical Pharmacology.

The online submission process includes the Scientific Submission Checklist (Table 1) on the Additional Information Screen at <https://ees.elsevier.com/bcp>. Failure to accurately complete the Scientific Submission Checklist questions, automatically disqualifies the work for consideration.

See Mullane et al., Guidelines for Manuscript Submission in the Peer-Reviewed Pharmacological Literature (Biochem.Pharmacol.97:225-235,2015; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003585>) for a detailed discussion of the issues addressed in the Scientific Submission Checklist.

Table 1. Scientific Submission Checklist Please answer the following questions with "Yes", "No", or "Not applicable".

Formatting Only video or audio files may be uploaded as supplementary data. The submission will automatically be rejected if the first question is marked "no" (i.e. supplementary tables or figures are not permitted).

1. As Biochemical Pharmacology does NOT publish supplemental data with the exception of audio or video files, are all necessary data included in the body of the manuscript? 2. Are all tables and figures numbered and appropriately titled with descriptive legends that permit stand-alone interpretation? Are all data shown in the tables and figures also described in the Results section, discussed in the Discussion section and stated in the Conclusions?

Introduction Section

6 Is there a clear statement with background describing the hypothesis being tested by this study? Are the primary endpoints clearly stated?

Materials and Methods Section

4. Were human tissues or fluids used in this study? Were the experiments reviewed and approved by the Institutional review Board (IRB)?

5. Were animals used in the study? Has the species, strain, sex, weight and source of the animals been provided? If used, is the method of anesthesia described? Were the experiments reviewed and approved by the Instructional Animal Care and Use Committee (IACUC).

6. Are the source(s) and passage number of cell lines indicated and authenticated by you or the vendor?

7. Is (are) the chemical structure(s) of any new compound(s) presented as a figure or referenced in the peer-reviewed literature?
8. Are the sources of all materials clearly indicated? If used, has the selectivity of antibodies and/or interference RNA been validated and their source clearly indicated?
9. Is the rationale for the selection of concentrations, doses, route and frequency of compound administration provided?
10. Are quantified results (e.g., IC50 and/or EC50 values) of concentration- and dose-response experiments included in the manuscript?
11. Are all group sizes approximately the same and clearly indicated in the text and/or in the tables and figures?
12. Were the criteria used for excluding any data from analysis determined prospectively and clearly stated?
13. Was the investigator responsible for data analysis blinded to which samples/animals represent control and treatment groups?
14. Are the reported data displayed as means +/- standard deviation (SD)? Is the number of replicates of three or more independent experimental observations clearly indicated? Were post-hoc tests used to assess the statistical significance among means? Is the threshold for statistical significance (P value) clearly indicated?

Results Section

15. If western blots are shown, are the appropriate loading controls, replication data, and quantification and statistical analysis shown?
16. If PCR and RT-PCR are included, were MIQE guidelines followed? Was a reference standard (positive or negative controls) included in the study to validate the experiment?

Discussion Section

17. Are the primary conclusions and any secondary endpoints and their implications clearly stated? 18. Are the limitations of the current study or alternative interpretations of the findings clearly stated?

Conflict of Interest/Financial Support

19. Is a conflict of interest statement included in the manuscript?
20. Are all organizations providing funding for this work listed in Acknowledgements? In the online submission system, please list any additional explanation(s) you feel may be necessary on the above questions.

Please list any additional explanation(s) you feel may be necessary on the above questions:

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research: Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Submission

All articles must be submitted online at <http://ees.elsevier.com/bcp>. Initial manuscripts may be submitted as pdfs but revised manuscripts must be uploaded as separate editable files (e.g. text and tables in Word or LaTeX and figures in common artwork formats see <https://www.elsevier.com/authors/author-schemas/artwork-and-media-instructions>).

Institutional Email Address

As of January 1st, 2016 manuscripts will not be considered for publication in Biochemical Pharmacology if the email address for the corresponding author does not reflect an affiliation with a research-based institution. Alternatively, the submission must be accompanied by a separate statement in English on institutional letterhead, which is signed by an official responsible for research activities for the institute from which the manuscript originates, verifying the corresponding author is affiliated with the research institution. The statement must also include official's institutional email address and full contact information.

PREPARATION

Manuscript preparation

Language

Neither the Editorial Board nor the reviewers will provide detailed advice for improving the grammar and clarity of a manuscript, regardless of the scientific merit of the work. Authors are responsible for ensuring the article is written in clear English. Either American or British usage is accepted, but not a combination of the two. The use of spell-check and grammar-check offered in the word processing software is highly recommended. Manuscripts lacking linguistic clarity or that are not prepared according to the style guidelines outlined below will not be considered for publication. Authors can have their manuscript language-edited.

Article Layout

Reports must be written in English with the pages numbered sequentially. The text must be double-spaced in single-column format with 1" or 25 mm margins. Size 12 (point) Times Roman or Arial font is preferred. The article must be divided into clearly defined and numbered

sections. The required sections are 1. Introduction, 2. Materials and Methods, 3. Results, 4. Discussion, and References. See Mullane et al.,

Guidelines for Manuscript Submission in the Peer-Reviewed Pharmacological Literature (Biochem. Pharmacol. 97:225-235, 2015;

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003585>) for a detailed discussion of the topics that must be covered in each section. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2,), 1.2, etc. The abstract is not included in section numbering. This numbering should be used for internal cross-referencing in the text. Subsections may be assigned a brief heading that appears alone on a separate line.

Title and Abstract

The article title should be concise but informative. All abbreviations must be spelled out fully when first mentioned in the abstract or body of the report.

Keywords

Immediately following the abstract the authors must provide up to 6 keywords for indexing purposes. American spelling must be used, avoiding general and plural terms and multiple concepts. Only established abbreviations may be proposed as keywords.

Acknowledgments

Acknowledgments must be listed in a separate section at the end of the article before the references. The Acknowledgments should include the names of individuals, organizations and funding agencies that provided assistance in underwriting and reporting the work.

Nomenclature and abbreviations

Receptor and ion channel nomenclature must conform to guidelines of the Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) (<http://www.guidetopharmacology.org/nomenclature.jsp>). Use only abbreviations that are generally accepted by the scientific community. Click [HERE](#) to view the full list of abbreviations that can be employed without definition. Drugs or other compounds should only be identified by their chemical or generic names. The source, including company name and location, for all chemicals, reagents, cell lines, tissue, and experimental animals must be provided in Materials and Methods.

GenBank

GenBank accession numbers should be typed in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized. Example: a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**) In the final electronic version of the article, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases.

Equations and formulae

Equations and formulae should be typed and numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page (if referred to explicitly in the text).

N:\images\BCP equation.jpg

They should be separated before and after the surrounding text by one line.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly and numbered consecutively throughout the text. Indicate the position of footnotes in the text and list them separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Figure Legends

Illustrations must have a caption that is listed separately from the figure in the submitted version of the work. The caption should be self-explanatory without the need to reference the accompanying text. All symbols appearing on the illustration must be clearly defined in the figure legend.

Tables

All tables must be numbered consecutively in Arabic numerals and cited in the text in their order of appearance. Table titles should be brief and descriptive. Tables should appear individually on separate pages in the submitted version of the work, together with a legend that includes sufficient information about the experimental protocol and results so the reader does not have to refer back to the text to understand the experimental protocol and findings. Tables should not have vertical lines, and the number of horizontal lines should be minimized.

References

Citations in text

Ensure that every reference cited in the text is present in the reference list, and vice versa. Unpublished results and personal communications should not appear in the reference list, but may be indicated in the text.

Data References

While *Biochemical Pharmacology* does not publish supplemental tables or figures, it is acknowledged that some relevant datasets are too large to print in a volume of the journal. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with extensive datasets, giving readers access to underlying data too large to print to offer a better understanding of the research described. Cite underlying or relevant datasets in your text and include a data reference in your Reference List.

Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.
<http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities too large to print through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC:734053; PDB: 1XFN).

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting for the initial submission. References can be in any style or format as long as they are consistent within the manuscript. Regardless of the format, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be shown. Use of DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager/>: Elsevier [Numeric, with titles]) and also others like EndNote (<http://endnote.com/downloads/style/biochemical-pharmacology>) <http://refman.com/downloads/styles/>.

Graphical Abstract

Authors asked to submit a revised version of the work for consideration must also supply a graphical abstract at that time. The graphical abstract, which will be displayed on the online Table of Contents, should provide a concise summary of the work in pictorial form designed to capture the attention of a wide audience and for compilation of databases. Graphical Abstract text should not exceed 30 words.

The content of the graphical abstract must be kept within an area of 5 cm tall by 17 cm wide (landscape shape). Authors are encouraged to limit graphical abstracts to 189 pixels tall by 642 pixels wide to ensure the image and text will be legible when displayed online. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. See <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00062952/94/2> for examples of graphical abstracts.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to learn about available data visualization options and how to include them with your article.

After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word:

in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.