

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

**TESE DE DOUTORADO**

**RELAÇÃO ENTRE AS VIAS DE REPARO DE QUEBRAS DUPLAS E**  
**EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS EM RESPOSTA ÀS LESÕES INDUZIDAS**  
**POR INIBIDORES DE TOPOISOMERASE 2**

**Franciele Faccio Busatto**

**Porto Alegre, maio de 2019.**

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

**RELAÇÃO ENTRE AS VIAS DE REPARO DE QUEBRAS DUPLAS E**  
**EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS EM RESPOSTA ÀS LESÕES INDUZIDAS**  
**POR INIBIDORES DE TOPOISOMERASE 2**

**Franciele Faccio Busatto**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientadora: Dra. Jenifer Saffi**

**Porto Alegre, maio de 2019.**

*"Be kind, for everyone you meet  
is fighting a hard battle"*  
*Ian Maclaren*

## AGRADECIMENTOS

Posso dizer que os últimos anos foram compostos diferentes batalhas diárias para chegar até aqui; algumas maiores, outras menores, mas com certeza todas elas se tornaram muito mais fáceis com a presença de algumas pessoas, as quais vou agradecer aqui.

Agradeço à minha orientadora Jenifer, pela oportunidade que me foi dada lá em 2011 abrindo as portas do seu laboratório para um estágio de iniciação científica, e por toda a confiança e supervisão para que eu pudesse chegar até a conclusão desta tese “com as minhas próprias pernas”. Com certeza aprendi muito contigo, não só cientificamente, mas também sobre a vida, sobre orientação, sobre focar, acreditar e buscar nossos objetivos e ainda, sobre lidar com pessoas.

Aos meus colegas do laboratório de Genética Toxicológica, Ana Moira, Paula, Jeferson, Luiza, Helena e Bruna, pelo companheirismo diário, conversas científicas e não tão científicas assim. Em especial à Jaqueline, por ter me co-orientado desde o início da iniciação científica e me ensinado tanto experimentalmente, bem como intelectualmente.

Um agradecimento especial à minha IC Victória Viero, que ficou comigo quase toda a minha jornada na pós-graduação, desde o mestrado até praticamente o final do doutorado. Obrigada por ter acreditado nas minhas ideias e encarado como se fossem tuas também, sempre com o objetivo de fazer o projeto andar da melhor maneira possível.

I will switch to English to thank my supervisor in Canada, Dr Jean-Yves Masson, for being an incredible supervisor opening his lab for me even without knowing me, trusting on me to develop my own project at his lab and inviting me to come back for a second experience. For all the opportunities I had in his lab, the knowledge and learning, a lot related to science but some related to life, that were also very important. I can say the experience at JYM`s lab was essential for me to arrive here today for the PhD degree.

I also would like to thank my lab mates from JYM`s lab, Laura, Daryl, Yuandi, Thibaut, Julia, Nadine, Richa, Mandy, Laure and Larissa, for receiving me so well in the lab, and for all the moments we had in Quebec city, making easier my experience away from home. A special thank you to Yan, Marie-

Christine and Amélie, for all the technical and scientific support during my 2 experiences at JYM`s lab.

Um agradecimento também a minha amiga Simone, a qual a ciência me apresentou, mas com quem eu aprendi muito além da ciência também, e que tornou minha última estada em Québec muito mais agradável.

Agradeço à CAPES pela oportunidade de desenvolver o doutorado com bolsa, possibilitando que eu me dedicasse plenamente ao trabalho; bem como a bolsa de doutorado sanduíche, que fez toda a diferença na minha formação.

Um agradecimento ao PPGBCM, em especial à Silvia mimosa! Por toda a ajuda ao longo destes anos com tantos processos burocráticos para chegar até aqui.

Não poderia deixar de agradecer também a minha família. Às minhas tias, Juraci e Ilisete, e ao Milton, por todo o apoio e incentivo constantes. À minha sogra Marlene, por todo o companheirismo e apoio nos últimos anos.

Um agradecimento especial ao meu noivo Leonardo, que está ao meu lado desde o TCC da graduação, e desde então vem me acompanhando nesta jornada louca que é a vida acadêmica. Muitas vezes instável, com altos e baixos, com certeza ele foi quem mais sentiu e passou de perto comigo por todos esses sentimentos, mas sempre me reerguendo e ajudando com que eu me encontrasse quando tudo parecia perdido. Obrigada por todo o apoio, companheirismo e amor.

E por fim, mas não menos importante, talvez até A mais importante, um grande agradecimento à minha mãe Maria. Meu maior orgulho e inspiração para chegar até aqui, que sempre me deu todo o apoio incondicional para que eu seguisse neste longo caminho da vida acadêmica. Por todo incentivo na minha educação e na minha formação como pessoa, por todo o amor e por toda compreensão da distância diária.

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS

A presente tese foi desenvolvida nos laboratórios de Genética Toxicológica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e no *Genome Stability laboratory* do *Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval*, Québec, Canadá. Este trabalho foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil - Projeto No. 12/1926-9), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil – Projeto No. 479564/2013-2), PRONEX - FAPERGS/CNPq (Projeto No. 10/0044-3) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brasil). As etapas desenvolvidas no Canadá foram financiadas pelas bolsas do programa CAPES-PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior) e pelo programa ELAP (*Emerging Leaders in the Americas Program*) que possibilitaram a ida da aluna, bem como financiamentos próprios do pesquisador Jean-Yves Masson para a realização de experimentos em seu laboratório.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
1.1 QUIMIOTERAPIA.....	19
1.1.1 <i>Inibidores de Topoisomerasas</i> .....	20
1.1.1.1 Inibidores de topoisomerase 1 .....	25
1.1.1.2 Inibidores de topoisomerase 2 .....	26
1.2 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER COM INIBIDORES DE TOP2 .....	31
1.3 HETEROGENEIDADE TUMORAL E RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA .....	34
1.4 MECANISMOS DE REPARO DE DNA .....	38
1.4.1 <i>Reparo por excisão de nucleotídeos</i> .....	40
1.4.1.1 Reconhecimento das lesões via GGR.....	43
1.4.1.2 Reconhecimento das lesões via TCR.....	44
1.4.1.3 Verificação e excisão da lesão e re-síntese da nova porção.....	45
1.4.2 <i>Mecanismos de reparo de quebras duplas no DNA</i> .....	47
1.4.2.1 Reparo de DSBs via NHEJ .....	48
1.4.2.2 Reparo de DSBs via HR.....	50
1.4.3 <i>Reparo das lesões induzidas por inibidores de TOP2</i> .....	54
1.5 CSB X REPARO DE DSBs X R-LOOPS .....	56
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
<b>3. CAPÍTULO I: “ROLE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR PROTEINS IN RESPONSE TO DNA DAMAGE INDUCED BY TOPOISOMERASE II INHIBITORS” .....</b>	<b>61</b>
<b>4. CAPÍTULO II: “EVALUATION OF CSB – TOPOISOMERASE 2 INTERACTION AND R-LOOPS FORMATION IN RESPONSE TO TOPOISOMERASE 2 INHIBITORS” .....</b>	<b>73</b>
<b>5. CAPÍTULO III: “ANALYSIS OF CELL GROWTH AND NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR PATHWAY MODULATION IN BREAST CANCER CELLS SUBMITTED TO A CHEMOTHERAPEUTIC PROTOCOL USING DOXORUBICIN AND PACLITAXEL” .....</b>	<b>98</b>
<b>6. DISCUSSÃO INTEGRADA.....</b>	<b>121</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>134</b>
7.1 CONCLUSÃO GERAL .....	134
7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS .....	134
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>136</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC *transporters* - proteínas transportadoras da família ABC (do inglês – *ATP Binding Cassette*)

ACT - sigla para o protocolo quimioterápico que usa os fármacos com nomes comerciais Adriamicina, Ciclofosfamida e Taxol

alt-NHEJ - Junção alternativa de extremidades não homólogas (do inglês - *alternate nonhomologous DNA end joining*)

BCRP1 - *Breast Cancer Resistance Protein 1*

BRCA1 - *Breast and ovarian cancer type 1*

CPD - *cumulative population doubling*

CS - Síndrome de Cockayne (do inglês - *Cockayne's Syndrome*)

CSA - Síndrome de Cockayne grupo A (do inglês - *Cockayne Syndrome complementation group A*)

CSB - Síndrome de Cockayne grupo B (do inglês - *Cockayne Syndrome complementation group B*)

DART assay - Ensaio de dano ao DNA em local de transcrição de RNA (do inglês - *DNA damage at RNA transcription*)

DDR - Resposta a danos ao DNA (do inglês - *DNA damage response*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês - *deoxyribonucleic acid*)

DNA Pol - DNA polimerase

DOX - Doxorrubicina

DRIP - Imunoprecipitação de híbridos de DNA:RNA (do inglês – *DNA:RNA immunoprecipitation*)

DSBs - Quebras duplas de DNA (do inglês - *double strand breaks*)



ERCC1 - *Excision Repair Cross-complementing-1*

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ETO - Etoposídeo

FDA - *Food and Drug Administration*

GGR - Reparo global do genoma (do inglês – *global genome repair*)

HMGN1 - *High mobility group nucleosome binding domain 1*

HR - Recombinação homóloga (do inglês - *homologous recombination*)

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

ICL - Pontes intercadeias (do inglês – *interstrand crosslink*)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IR – Radiação ionizante (do inglês – *ionizing radiation*)

KD – *knockdown*

KO - *knockout*

MDR - Resistência a múltiplas drogas (do inglês - *multidrug resistance*)

MDR1 - *Multidrug Resistance protein 1*

mRNA - RNA mensageiro

MRP1 - *Multidrug Resistance-associated Protein 1*

MXT - Mitoxantrona

NER - Reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês – *Nucleotide excision repair*)

NHEJ - Junção de extremidades não homólogas (do inglês - *nonhomologous DNA end joining*)

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PCTX - Paclitaxel

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês – *polimerase chain reaction*)

qPCR - PCR quantitativa em tempo real (do inglês – *quantitative PCR*)

RFC - Fator de replicação C (do inglês - *Replication Factor C*)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês – *ribonucleic acid*)

RNA Pol II - RNA polimerase II

RPR - Taxa de proliferação relativa (do inglês – *relative proliferation rate*)

SSA - Anelamento de simples fita (do inglês - *single-strand annealing*)

SSBs - Quebras simples de DNA (do inglês - *single strand breaks*)

TC-HR - Reparo por recombinação homóloga acoplado à transcrição (do inglês – *transcription coupled - homologous recombination*)

TCR - Reparo acoplado à transcrição (do inglês – *transcription coupled repair*)

TFIIS - *Transcription factor II-S*

TFIIH - *Transcription factor II-H*

TOP1 - DNA Topoisomerase 1

TOP1mt - DNA Topoisomerase 1 mitocondrial

TOP2 $\alpha$  - DNA Topoisomerase 2 alfa

TOP2 $\beta$  - DNA Topoisomerase 2 beta

TOP3 $\alpha$  - DNA Topoisomerase 3 alfa

TOP3 $\beta$  - DNA Topoisomerase 3 beta

Topcc - Complexos cliváveis com o DNA e a Topoisomerase (do inglês - *topoisomerase cleavable complex*)

Top2cc - Complexos cliváveis com o DNA e a Topoisomerase 2 (do inglês - *topoisomerase 2 cleavable complex*)

TTD - Tricotiodistrofia (do inglês – *Trichothiodystrophy*)

UV-DDB - *UV-damaged-DNA-binding protein*

XAB2 - *XPA binding protein 2*

XP - *Xeroderma pigmentosum*

XPA - Xeroderma pigmentoso grupo A (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group A*).

XPB - Xeroderma pigmentoso grupo B (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group B*).

XPC - Xeroderma pigmentoso grupo C (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group C*).

XPD - Xeroderma pigmentoso grupo D (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group D*).

XPE - Xeroderma pigmentoso grupo E (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group E*).

XPF - Xeroderma pigmentoso grupo F (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group F*).

XPG - Xeroderma pigmentoso grupo G (do inglês - *Xeroderma pigmentosum complementation group G*).

$\gamma$ H2AX - Histona H2AX fosforilada

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Representação das diferentes formas de remoção das supertorções no DNA através das 6 topoisomerasas humanas que são divididas nas classes I e II

**Figura 2.** Estrutura química das moléculas de Doxorubicina, Mitoxantrona e Etoposídeo

**Figura 3.** Principais mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos

**Figura 4.** Representação das diferentes fontes de danos ao DNA e vias de reparo

**Figura 5.** Representação resumida dos eventos da via NER

**Figura 6.** Representação das vias NHEJ e HR para reparo de quebras duplas no DNA

### CAPÍTULO I

**Figure 1.** *Different action mechanisms of topoisomerase I and II in the formation of DNA cleavage complexes*

**Figure 2.** *Topoisomerase inhibitor structures*

**Figure 3.** *Representation of possible lesions induced by topoisomerase II inhibitor type poisons*

**Figure 4.** *Proposed mechanism for NER interaction with topo II inhibitors*

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** *siXPC induces less 53BP1 and  $\gamma$ H2AX foci than siERCC6*

**Figure 2.** *CSB physically interacts with TOP2A and TOP2B*

**Figure 3.** *R-loops immunoprecipitation through DRIP-qPCR*

**Figure 4.** *Depletion of TOP2A and TOP2B increases R-loops at transcribed regions with local ROS-induced DNA damage*

### **CAPÍTULO III**

**Figure 1.** *Timeline used to apply the chemotherapy protocol and follow-up the cells*

**Figure 2.** *Cumulative Population Doubling (CPD) of the four replicates performed comparing MCF7 cells under normal conditions and those submitted to the chemotherapy protocol*

**Figure 3.** *Representative images of MCF7 morphology after one cycle of treatment with DOX (A) and PCTX (B)*

**Figure 4.** *A recovery period after the application of the chemo cycles takes over normal CPD*

**Figure 5.** *Representation of 4 different parameters that reflect the overall effect of the protocol applied*

**Figure 6.** *Gene expression evaluation through qPCR*

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

**Tabela 1.** Classificação das topoisomerasas humanas.

### CAPÍTULO I

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

### CAPÍTULO II

**Table S1.** *Primers used for DRIP-qPCR*

### CAPÍTULO III

**Table 1.** *Primers used in the study for qPCR analysis*

## RESUMO

O câncer se caracteriza por uma doença multifatorial e de alta complexidade, tornando-se, nas últimas décadas, um problema de saúde pública mundial. Dentre as principais abordagens de tratamento encontra-se a quimioterapia, que utiliza drogas com diferentes mecanismos de ação para atacar e controlar a proliferação das células tumorais, levando-as à morte. Existem então muitas estratégias para o combate desta doença, no entanto, apesar da ampla variedade e eficiência de muitos quimioterápicos, muitos tumores ainda apresentam resistência, tornando o tratamento parcial ou totalmente ineficaz. Alguns mecanismos podem estar relacionados ao desenvolvimento desse perfil de resistência, sendo o mais estudado o aumento do efluxo das drogas através de proteínas de membrana celular. Por outro lado, uma alteração nas vias de reparo de DNA também contribui para a resistência tumoral, uma vez que as lesões geradas pelos quimioterápicos são removidas antes mesmo de se tornarem citotóxicas para as células, reduzindo assim a efetividade da droga. Dentre as vias de reparo de DNA, a via do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é uma das mais versáteis, e há estudos que demonstram seu envolvimento em resposta às lesões geradas por inibidores de Topoisomerase 2 (TOP2), uma importante classe de quimioterápicos utilizada no tratamento de tumores de mama, osteosarcomas, leucemias, entre outros. Os trabalhos apresentados nesta tese tiveram como objetivo (1) compreender melhor o mecanismo de formação de lesões no DNA pelos inibidores de TOP2 e a influência da via NER, mais especificamente da proteína CSB, na resposta a estas lesões mediando a formação de quebras duplas no DNA; e (2) aplicar *in vitro* em células de câncer de mama um protocolo quimioterápico com um fármaco inibidor de TOP2 semelhante ao utilizado na clínica e avaliar a resposta destas células a longo prazo, mesmo após o final do tratamento, bem como analisar a expressão de genes da via NER em diferentes pontos deste protocolo. Além de apresentar uma revisão da literatura que aborda o papel das vias de reparo de DNA, com maior enfoque na via NER, em resposta a inibidores de TOP2, os demais trabalhos desenvolvidos durante a tese demonstram haver uma interação física da proteína CSB com TOP2 em resposta à tratamentos com inibidores de TOP2, encontrado por co-imunoprecipitação. Além disso, verificamos que a ausência de TOP2 por silenciamento gênico, mas não a sua inibição, favorece o acúmulo de estruturas como R-loops, híbridos de DNA:RNA que causam instabilidade genômica, no entanto não conseguimos relacionar a presença de CSB neste contexto. Com relação à aplicação do protocolo clínico nas células tumorais de mama, observamos que a proliferação das células tratadas foi bastante reduzida durante todo o protocolo utilizado, combinação de Doxorrubicina (DOX) e Paclitaxel. No entanto, quando as células foram acompanhadas ao final dos ciclos de DOX, ou ao final do protocolo completo, ambas as situações demonstraram que as células remanescentes apresentaram potencial para retomar seu crescimento. Ainda assim, de maneira geral pode-se dizer que a longo-prazo o protocolo utilizado apresentou uma boa eficiência em controlar esta proliferação. Ao analisar os níveis de expressão de diferentes genes da via NER após 1 ou 4 ciclos de tratamento com DOX constatamos uma maior expressão dos genes XPA, XPC, ERCC6 e ERCC4, bem como do gene MRE11, envolvido na reparação de quebras duplas, em relação às células não tratadas.

**Palavras-chave:** *inibidores de Topoisomerase 2, reparo de DNA, câncer, reparo por excisão de nucleotídeos (NER)*



## ABSTRACT

Cancer is characterized by a multifactorial and highly complex disease, becoming, in the last decades, a world public health problem. Among the main approaches to treat this disease is chemotherapy, which uses drugs with different mechanisms of action to attack and control the proliferation of tumor cells, leading to death. Nowadays there are many strategies to combat this disease, however, despite the wide variety and efficiency of the chemotherapeutic drugs, many tumors still show resistance, resulting in a partially or totally ineffective treatment. There are some mechanisms known to be related to the development of this resistance profile, and the most studied one is the modulation of membrane proteins to increase the efflux of the drugs from the cells. Besides that, changes in DNA repair pathways also contribute to tumor resistance, since the chemotherapy-generated lesions can be removed before they become cytotoxic, thus reducing the effectiveness of the drug. Among DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair (NER) is one of the most versatile, and there are studies showing and involvement of this pathway in response to Topoisomerase 2 (TOP2) inhibitors-induced lesions, which is an important class of chemotherapeutic used in the treatment of breast tumors, osteosarcomas, leukemias, etc. Considering that, the works presented in this thesis had 2 main goals: (1) understand the mechanism by which TOP2 inhibitors generate their lesions in the DNA and their influence of NER, more specifically CSB protein, in response to these lesions to mediate Double Strand Breaks (DSBs) in the DNA; and (2) apply a chemotherapy protocol using a TOP2 inhibitor similar to what is used in clinical practice and evaluate the long-term response of these cells, as well as analyze NER-genes expression at different time- points in this protocol. We present here a review that addresses the role of DNA repair pathways, focusing more on NER, in response to TOP2 inhibitors; besides that, the other works developed during the thesis demonstrate a physical interaction of CSB and TOP2 in response to treatments with TOP2 inhibitors, found by co-immunoprecipitation. In addition, we found that the absence of TOP2 by siRNA, but not its pharmacological inhibition, favors the accumulation of structures such as R-loops, DNA:RNA hybrids that cause genomic instability, but we could not relate the presence of CSB in this context. Regarding the application of the clinical protocol in breast tumor cells, we observed that the proliferation of the treated cells was greatly reduced throughout the protocol used, a combination of Doxorubicin (DOX) and Paclitaxel (PCTX). However, when cells were monitored at the end of DOX cycles, or at the end of the complete protocol, both situations demonstrated that the remaining cells had the potential to resume their growth. Nevertheless, in general we can conclude that at a long-term analysis, the protocol used presented a good efficiency in controlling this proliferation. When analyzing the expression levels of different NER genes after 1 or 4 DOX cycles we found a higher expression of XPA, XPC, ERCC6 and ERCC4 genes, as well as of MRE11, involved in the repair of DSBs, in relation to untreated cells.

**Keywords:** *Topoisomerase 2 inhibitors, DNA repair, cancer, Nucleotide Excision Repair (NER)*

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

O câncer é um conjunto de doenças que têm início lento e crescimento celular anormal e desordenado. O desencadeamento desta doença ocorre por motivos variados, podendo ser devido a fatores herdados ou adquiridos. Entretanto, independente da origem, esses fatores levam a lesões ou alterações no DNA. As lesões, caso reparadas por vias proteicas passíveis de erro ou, ainda, se não reparadas, podem tornar-se mutações que implicam na alteração da homeostase celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; POLYAK; HAVIV; CAMPBELL, 2009). As mutações conhecidas como *drivers* no câncer são responsáveis pelo começo do processo tumoral e, geralmente, estão associadas aos genes reguladores de ciclo e de morte celular, permitindo que a célula cresça desordenadamente e não seja encaminhada a apoptose. Assim sendo, a falta de controle na divisão celular promove instabilidade genômica bem como a aquisição de novas mutações. Além disso, este novo fenótipo pode levar a célula a formar uma massa tumoral capaz de invadir tecidos adjacentes originando, assim, metástases. Esse conjunto de processos que iniciam a formação de um tumor é denominado carcinogênese (HYNDMAN, 2016; REITER et al., 2012). A carcinogênese é um processo de natureza estocástica, ou seja, com origem em eventos aleatórios, o que torna os tumores heterogêneos, devido à variação de genes mutados (DAGOGO-JACK; SHAW, 2017; MCGRANAHAN; SWANTON, 2017).

A complexidade do câncer é um desafio para estudo, prevenção e tratamento. Além disso, o aumento de sua dimensão nas últimas décadas tornou-se um problema de saúde pública mundial. Para o ano de 2019, foi estimado o diagnóstico de 1,7 milhões de novos casos no mundo (AMERICAN

CANCER SOCIETY, 2019) e, segundo o *World Cancer Report 2014* da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), até 2025 espera-se mais de 20 milhões de novos casos no mundo. No Brasil, a estimativa de incidência do câncer, publicada em 2018, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), espera para o biênio 2018-2019 cerca de 1,2 milhões de novas ocorrências. Sendo o câncer de mama o de segunda maior incidência mundial e o de maior frequência entre as mulheres (25,2%). Na população brasileira as estimativas apontam o surgimento de 59.700 novos casos de câncer de mama para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Apesar de o processo de desenvolvimento do câncer ter sido reconhecido há séculos, pouco se sabia sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão do tumor até o advento da medicina molecular na segunda metade do século XX. Inicialmente, as estratégias de tratamento eram baseadas principalmente na cirurgia, sendo que o início da terapia com uso de radiação ocorreu somente por volta de 1960, porém, sua efetividade era limitada a tumores localizados (CHABNER; ROBERTS JR, 2005). Hoje em dia podemos dizer que entre as principais opções de tratamento estão a radioterapia, imunoterapia, terapias-alvo, remoção cirúrgica e a quimioterapia, que é uma das terapias mais utilizadas, isolada ou combinada com as terapias anteriores (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Na quimioterapia são utilizadas inúmeras drogas que atuam em diferentes alvos celulares (NEIDLE; THURSTON, 2005). Apesar disso, a eficácia deste tipo de tratamento muitas vezes se torna limitada, uma vez que muitos tumores ainda apresentam resistência aos tratamentos quimioterápicos (HOLOHAN et al.,

2013).

### **1.1 Quimioterapia**

O uso da quimioterapia para o tratamento do câncer surgiu no início do século XX, quando o químico Paul Ehrlich começou a desenvolver drogas para tratar doenças infecciosas. Foi ele quem definiu o termo “quimioterapia” como o uso de agentes químicos (drogas) para o tratamento de doenças (DEVITA; CHU, 2008). Por um longo período no século passado, a radioterapia e a cirurgia dominaram o campo das terapias contra o câncer, no entanto, a taxa de cura começou a apresentar-se cada vez mais baixa, uma vez que os pacientes desenvolviam também metástases, que não eram atingidas com esse tipo de tratamento localizado. Os primeiros registros do uso de drogas no tratamento de tumores iniciaram na década de 1940, com o uso de mostardas nitrogenadas no tratamento de linfomas não-Hodgking e leucemias, bem como os primeiros estudos sobre o efeito do ácido fólico e análogos no tratamento de leucemias. Apesar de estes estudos iniciais terem tido remissão dos tumores por curtos períodos, demonstraram o princípio de que a administração de drogas via sistêmica poderia levar a regressão dos tumores, sendo marcos para o início da quimioterapia moderna (CHABNER; ROBERTS JR, 2005; CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013).

Com o passar dos anos, observou-se que a combinação da quimioterapia com cirurgia ou radioterapia apresentava um resultado muito mais efetivo na eliminação do tumor, e passou-se então a combiná-la com diferentes abordagens terapêuticas (DEVITA; CHU, 2008). Atualmente, a quimioterapia pode ser utilizada como única alternativa de tratamento, no entanto, é mais

frequentemente associada a outras terapias, como remoção cirúrgica e radioterapia.

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

### 1.1.1 Inibidores de Topoisomerasas

As DNA topoisomerasas são enzimas fundamentais na manutenção do

metabolismo e estrutura da molécula de DNA. Presentes desde organismos inferiores, como as archeas, até organismos superiores, como os humanos, são enzimas vitais pois resolvem problemas topológicos do DNA, resultantes da separação da estrutura de dupla-hélice durante os processos de replicação e transcrição (POMMIER, 2013; POMMIER et al., 2016). Essa abertura da dupla-hélice tem como consequência a geração de supertorções na molécula de DNA, as quais quando não são relaxadas levam ao colapso da forquilha de replicação ou da bolha de transcrição, por exemplo. Quando as supertorções acontecem à frente do segmento de DNA que já está aberto chama-se supertorção positiva, e, nesses casos, inibe a continuação do processo de separação da dupla-fita para que a maquinaria de replicação tenha acesso, provocando assim a parada das DNA polimerases. Já as supertorções que acontecem atrás das DNA polimerases são conhecidas como torções negativas, as quais por sua vez tendem a estender a separação da dupla-fita facilitando com que ocorram estruturas anormais de ácidos nucléicos, como G-quadruplexes, z-DNA, *hairpins* e R-Loops, os quais já foram relacionados com a parada da RNA Polimerase II (RNA Pol II) no processo de transcrição (POMMIER, 2013).

As DNA topoisomerases atuam então prevenindo a formação dessas estruturas, uma vez que aliviam essas supertorções através da geração de quebras transitórias no DNA pela clivagem de uma ligação fosfodiéster da cadeia de DNA, com a sua posterior re-ligação. Em humanos já foram identificadas 6 topoisomerases diferentes que tanto compartilham bem como possuem funções distintas, são elas: TOP1, TOP1mt (encontrada na mitocôndria), TOP3 $\alpha$ , TOP3 $\beta$ , TOP2 $\alpha$  e TOP2 $\beta$ . As quatro primeiras pertencem à classificação do tipo I, ou seja, são monoméricas e clivam somente uma fita de DNA para catálise. Já as

duas últimas, TOP2 $\alpha$  e TOP2 $\beta$ , são classificadas como tipo II por serem homodiméricas e clivarem ambas as fitas do dúplice de DNA (POMMIER, 2013; POMMIER et al., 2016). Além disso, existem algumas diferenças quanto ao mecanismo entre as 6 enzimas, as quais estão apresentadas na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1: Classificação das topoisomerases humanas.

<b>Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Classificação</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Clivagem</b>
<b>TOP1</b>	<i>TOP1</i>	Tipo I B	Rotação	Uma fita de DNA
<b>TOP1mt</b>	<i>TOP1MT</i>			
<b>TOP3<math>\alpha</math></b>	<i>TOP3A</i>	Tipo IA	Passagem de cadeia	
<b>TOP3<math>\beta</math></b>	<i>TOP3B</i>			
<b>TOP2<math>\alpha</math></b>	<i>TOP2A</i>	Tipo IIA	Passagem de cadeia/ ATPase	Duas fitas de DNA
<b>TOP2<math>\beta</math></b>	<i>TOP2B</i>			

A atividade catalítica das topoisomerases é mediada pelo mecanismo de passagem unidirecional de uma fita ou dúplice de DNA (dependendo da enzima em questão) através de uma quebra gerada pela própria enzima, resultando assim no relaxamento das supertorções (MARINELLO; DELCURATOLO; CAPRANICO, 2018). Independente de clivarem uma ou duas fitas de DNA, no momento de transição entre a quebra e a re-ligação, formam-se os chamados complexos cliváveis (*topoisomerase cleavable complex - Topcc*) de DNA com a enzima (representados no painel central da figura 1). Estes complexos são transitórios, uma vez que, conforme mencionado anteriormente, na fisiologia

normal das células essas quebras são temporárias para aliviar as supertorções, e logo são re-ligadas pelas próprias topoisomerases.

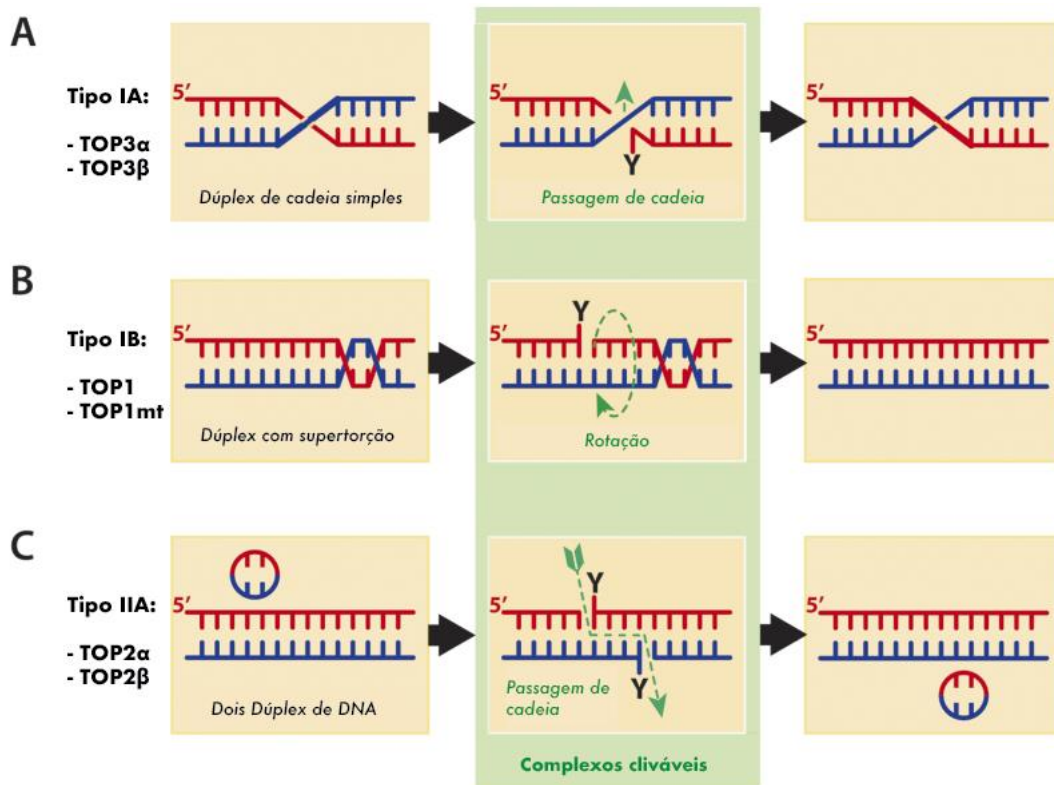


Figura 1: Representação das diferentes formas de remoção das supertorções no DNA através das 6 topoisomerases humanas que são divididas nas classes I e II. Em A e B as topoisomerases do tipo I clivam apenas uma das fitas do DNA para a passagem através da outra fita ou através de rotação. Em C as topoisomerases do tipo II clivam as duas fitas do DNA permitindo que a distorção ocorra através da passagem de um dúplice de DNA pelo outro. Entre a geração da quebra e a liberação do DNA intacto ao final formam-se os intermediários complexos cliváveis (Topcc) da enzima com o DNA. Fonte: adaptado de (POMMIER, 2013).

Por participarem de processos tão fundamentais para a manutenção do DNA, bem como da integridade das células, as topoisomerases emergiram como importante objeto de estudo para a relevância terapêutica de tratamentos com agentes antibacterianos e anticâncer (DELGADO et al., 2018). Os inibidores das enzimas topoisomerases são extremamente seletivos e não apresentam ambiguidade nas suas terapias-alvo. Dentre os fármacos desta classe



cl clinicamente relevantes, os inibidores de TOP1 não afetam a TOP2 e vice-versa. Além disso, os antibióticos, inibidores das topoisomerasas bacterianas (girase e topoIV), apresentam-se inativos contra as topoisomerasas da célula hospedeira, apresentando assim um grande potencial antibacteriano sem impacto no genoma do hospedeiro (NITISS, 2009; POMMIER, 2013).

O uso de inibidores de topoisomerasas na oncologia clínica é bastante amplo, uma vez que são drogas aprovadas como primeira linha de tratamento para diversos tumores sólidos e hematológicos. Entre estas drogas, as principais classes são as camptotecinas, antraciclinas e epidofilotoxinas, das quais os compostos principais foram descobertos entre as décadas de 1960 e 1970 (DI MARCO; CASSINELLI; ARCAMONE, 1981; MARINELLO; DELCURATOLO; CAPRANICO, 2018). Desde então a pesquisa por novos e mais eficientes análogos destes compostos tem sido bastante intensa, no entanto o que ainda se observa na clínica é o uso dos primeiros fármacos descobertos ou dos primeiros análogos desenvolvidos destas classes.

Os mecanismos de ação dos inibidores de topoisomerasas podem ser divididos em: envenenamento da enzima e inibição catalítica da enzima. O conceito de envenenamento surgiu, primeiramente, através dos fármacos antibióticos inibidores de topoisomerasas, e, foi demonstrado para os agentes anticâncer logo após a descoberta da TOP1 como alvo da Camptotecina, que é o principal inibidor de topoisomerasas do tipo I (HSIANG; LIU, 1988; HSIANG et al., 1985; POMMIER, 2013). Os inibidores classificados como venenos das topoisomerasas levam a um aumento nos níveis dos complexos cliváveis de DNA com a enzima, uma vez que se ligam a essas estruturas impedindo com que ocorra a re-ligação da quebra transitória no DNA. Por consequência a célula

pode acabar sofrendo apoptose, uma vez que fica com quebras permanentes no DNA em regiões que podem estar passando por síntese ativa de DNA. Ou seja, os venenos de topoisomerase aumentam os Topccs mediando danos irreversíveis no DNA preferencialmente em células que estão em proliferação, como as células tumorais, em comparação com as células normais pós-mitóticas (POMMIER, 2013; WILSTERMANN; OSHEROFF, 2003).

Já a segunda classe caracteriza-se pela inibição da atividade catalítica da enzima, sem gerar aumentos nos níveis dos Topccs. Os agentes desta classe atuam competindo com o DNA pelo sítio ativo da enzima, levando portanto à morte celular através da eliminação da atividade enzimática, a qual é essencial, e, por isso, são denominados inibidores catalíticos da topoisomerase (NITISS, 2009; POMMIER et al., 2010)

#### *1.1.1.1 Inibidores de topoisomerase 1*

Dentre as drogas que inibem a TOP1, somente a Camptotecina e seus derivados são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) atualmente. São derivados semi-sintéticos do alcaloide camptotecina da planta *Camptotheca acuminata*, e a identificação da TOP1 como alvo ocorreu apenas 20 anos após o seu uso como droga anticâncer (POMMIER, 2009, 2013). Um dos derivados da Camptotecina que já está em uso é o Topotecan, o qual é prescrito para câncer de ovário e câncer de pulmão de pequenas células recorrente. Outro derivado já aprovado pelo FDA é o Irinotecan, recomendado principalmente para câncer colorretal metastático em combinação com o quimioterápico 5-fluorouracil. O Irinotecan é uma pró-droga, que precisa ser convertida no seu metabólito

metabolicamente ativo SN-38 para apresentar efeito (POMMIER, 2009, 2013; POMMIER et al., 2010)

#### 1.1.1.2 Inibidores de topoisomerase 2

Conforme demonstrado na tabela 1, as células humanas codificam para duas isoformas de topoisomerase do tipo 2, TOP2 $\alpha$  e TOP2 $\beta$ . As principais classes de fármacos que inibem estas enzimas através do mecanismo explicado anteriormente de envenenamento da TOP2, o qual aumenta os níveis de complexos Top2cc levando a quebras persistentes no DNA, são as antraciclinas e as epidofilotoxinas.

As epidofilotoxinas são derivados semissintéticos da podofilotoxina, um produto natural isolado da planta *Podophyllum peltatum*, entretanto a sua grande toxicidade impossibilitou o uso na clínica, levando ao desenvolvimento de derivados com melhor atividade antineoplásica e menor toxicidade que são utilizados atualmente: o etoposídeo (ETO) e o teniposídeo (BALDWIN; OSHEROFF, 2005). O ETO está entre as primeiras drogas anticâncer que foram identificadas como inibidores de TOP2 e atualmente é a droga mais seletiva em termos de inibição desta enzima, uma vez que, diferentemente das antraciclinas, não atua como um agente intercalante, o que faz com que seu único mecanismo de ação seja a inibição da capacidade de religar a clivagem transitória gerada no DNA, estabilizando por consequência os complexos cliváveis Top2cc (BALDWIN; OSHEROFF, 2005; NAJAR; JOHRI, 2014; POMMIER, 2013). A estabilização do complexo se dá através da ligação de uma molécula de ETO a cada monômero da enzima, de modo que cada molécula estabiliza apenas uma quebra simples da cadeia do DNA, portanto, dependendo da razão molar entre

o ETO e a TOP2, podem ser geradas quebras simples ou quebras duplas de DNA, com a enzima ligada covalentemente a extremidade 5' através da ligação fosfotirosil (BROMBERG; BURGIN; OSHEROFF, 2002). Atualmente o ETO ainda é usado rotineiramente como primeira linha de quimioterapia combinada para câncer testicular, câncer de pulmão de pequenas células e linfoma não-Hodking (NAJAR; JOHRI, 2014). Já o teniposídeo é usado principalmente para tratamento de câncer de pulmão de pequenas células (após falha da terapia de primeira linha), carcinoma de cérvix e de ovário metastático (MICROMEDEX, 2015).

Na classe das antraciclina encontram-se a daunorrubicina e a doxorrubicina (DOX). A primeira foi descoberta na década de 1950, através do isolamento a partir da bactéria *Streptomyces peucetius*, porém, hoje em dia, a DOX, que foi descoberta na década seguinte, é a mais utilizada. Enquanto a daunorrubicina é comumente utilizada para tratamento de leucemias, a DOX é o quimioterápico de primeira linha no tratamento de câncer de mama, sendo também utilizada nos tumores de ossos, sarcoma de tecidos moles, bexiga, linfomas e mielomas múltiplos (BINASCHI et al., 2001; MINOTTI et al., 2004; NETO, 2013; MICROMEDEX, 2015).

Com o objetivo de melhorar a atividade e a tolerabilidade destes fármacos, alguns derivados e análogos foram desenvolvidos. A epirrubicina é um derivado semissintético da DOX, que permitiu melhoras na farmacocinética e metabolismo, como um elevado volume de distribuição e uma eliminação mais rápida (MINOTTI et al., 2004) e é usada principalmente no tratamento de câncer de mama (NETO, 2013; MICROMEDEX, 2015). Já a idarrubicina foi desenvolvida a partir da daunorrubicina, de modo que se obteve uma droga com

melhor lipofilicidade e absorção. Assim como a daunomomicina, a idarrubicina é usada principalmente no tratamento de leucemias (NETO, 2013; MICROMEDEX, 2015).

A mitoxantrona (MXT) é um outro análogo estrutural das antraciclina, que foi originalmente sintetizada com o objetivo de encontrar análogos com menor cardiotoxicidade, mas que mantivessem potente citotoxicidade. A MXT é um antineoplásico sintético que pertence à classe das antracenodionas (AU et al., 1981). Com relação à estrutura original das antraciclina, para a síntese da MXT foi retirado o açúcar daunosamina, o qual foi substituído por duas cadeias laterais amino-álquila idênticas. Foi mantido o anel policíclico planar aromático e desta forma, a capacidade de intercalar entre os pares de bases do DNA (figura 2) (LOWN et al., 1984; PARKER et al., 2000). Entre diversos análogos, a MXT apresentou melhor atividade, inclusive quando comparada à DOX, sendo selecionada posteriormente para estudos clínicos devido a sua potência e excelente atividade antitumoral em camundongos (AU et al., 1981; WHITE; DURR, 1985). Os estudos iniciais demonstraram que a MXT inibia a síntese de DNA, RNA e proteínas, suprimia a proliferação celular e induzia aberrações nucleares e alterações estruturais em células tumorais, semelhante as que eram induzidas pela DOX (WHITE; DURR, 1985). Pouco tempo depois, foi demonstrado que células resistentes as epipodofilotoxinas também apresentavam resistência cruzada com a MXT e a outras drogas como a DOX, e que isso possivelmente seria em função de possuírem um alvo comum (GLISSON et al., 1986). Neste mesmo ano então foi descoberto que a MXT inibia a TOP2 e que essa inibição ocorria somente *in vivo*, uma vez que a enzima purificada não era afetada pela droga (CRESPI et al., 1986).

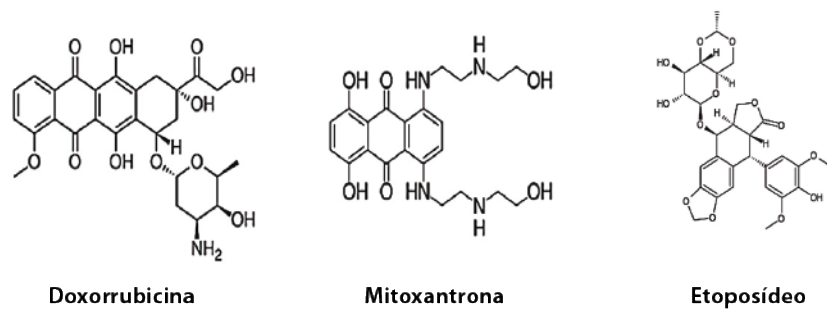


Figura 2: Estrutura química das moléculas de Doxorubicina, Mitoxantrona e Etoposídeo. A estrutura básica das antraciclinas como a DOX é formada por um anel tetracíclico ligado a um amino-açúcar. A mitoxantrona é um análogo estrutural das antraciclinas, das quais foram retirados o motivo amino-açúcar e o anel tetracíclico A, porém foi mantida a estrutura policíclica planar aromática que também permite a sua intercalação entre os pares de bases do DNA. Já o etoposídeo não apresenta estes anéis policíclicos, o que não lhe confere a característica de intercalante de DNA. Fonte: adaptado de (ROCHA et al., 2016a).

A farmacologia molecular e o mecanismo de ação das antraciclinas e seus análogos são complexos, exibindo algumas peculiaridades. Todas as antraciclinas consistem de um grupamento aglicona composto por um anel tetracíclico, ligado a um amino-açúcar, formando uma estrutura planar que possibilita com que sejam potentes intercalantes de DNA (figura 2) (BLASIAK; GLOC; WARSZAWSKI, 2002; MINOTTI et al., 2004). Além disso, podem sofrer a redução de um elétron e formar espécies reativas de oxigênio (ERO). Na presença de oxigênio e metais, o motivo quinona do anel C das antraciclinas pode ser reduzido a um radical semiquinona, que rapidamente pode ser regenerado à custa da oxidação do oxigênio e gerar ERO como o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, por fim gerando um radical hidroxil (BLASIAK; GLOC; WARSZAWSKI, 2002; MINOTTI et al., 2004). As antraciclinas também têm a capacidade de formar adutos no DNA, que podem ser detectados em células em cultura a partir do tratamento simples com DOX em doses abaixo

de 10 nM (COLDWELL et al., 2008). A formação destes adutos é favorecida pela presença de formaldeído, que nas células pode ser derivado a partir de uma gama de fontes de carbono. Além disso, células tumorais exibem níveis mais elevados de formaldeído comparado a células normais, podendo favorecer a toxicidade seletiva da DOX, formando mais adutos em células tumorais (CUTTS et al., 2005). A formação de lesões do tipo pontes intercadeias (ICL – *interstrand crosslink*) também é observada após tratamento de células tumorais com antraciclinas, sendo a citotoxicidade destes compostos fortemente correlacionada com a formação dos ICL (SKLADANOWSKI; KONOPA, 2000).

Apesar destes diferentes mecanismos, é amplamente aceito na literatura que a atividade anticâncer efetiva das antraciclinas é devido à sua atividade específica em células proliferativas, como as tumorais (MARINELLO; DELCURATOLO; CAPRANICO, 2018). Diferentes trabalhos já mostraram que o alvo celular das antraciclinas o qual é relevante para sua ação terapêutica é a TOP2 (BINASCHI et al., 2001; CAPRANICO et al., 1990; TEWEY et al., 1984). Estas drogas interferem com ambas as isoformas humanas, TOP2 $\alpha$  e TOP2 $\beta$ . A ação na isoforma  $\alpha$  é normalmente considerada a base molecular da atividade das antraciclinas, já que esta é a isoforma que apresenta seu papel principal durante os processos de replicação e proliferação celular. Já a isoforma TOP2 $\beta$  é mais associada aos efeitos colaterais a longo prazo dos tratamentos com estes fármacos, como cardiotoxicidade e desenvolvimento de malignidades secundárias; no entanto, também parece contribuir para a atividade com fim de eliminação das células tumorais esperada para as antraciclinas (CORNAROTTI et al., 1996; MARINELLO; DELCURATOLO; CAPRANICO, 2018)

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

### **1.2 Estratégias de tratamento do câncer com Inibidores de TOP2**

Atualmente existem inúmeros regimes de protocolos de quimioterapia aplicados na clínica. Pode-se dizer que quando o tratamento quimioterápico reduz o tamanho do tumor antes da cirurgia ou radioterapia trata-se de um tratamento neoadjuvante. Já quando o uso das drogas quimioterápicas é feito após radioterapia ou cirurgia, a fim de destruir as células cancerígenas remanescentes, denomina-se terapia adjuvante (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018; NEIDLE; THURSTON, 2005).

Um dos tumores que mais se beneficia com o uso de antraciclinas, principalmente a DOX, é o câncer de mama. O uso destas drogas no tratamento deste tipo de tumor costuma ser bastante eficiente, sendo esta classe de medicamentos considerada, dentre as combinações de diferentes classes utilizadas, os agentes mais ativos contra o câncer de mama (AZIM et al., 2011; MINOTTI et al., 2004; MIRZAEI et al., 2013). Um dos exemplos mais utilizados é a combinação de DOX com ciclofosfamida e paclitaxel (PCTX), também conhecido como protocolo ACT (dos nomes comerciais - Adriamicina, Ciclofosfamida, Taxol), sendo aplicado em diferentes regimes de ciclos quimioterápicos, com intervalos de 2 até 4 semanas entre os ciclos (ONCOLINK,



2019).

Sabe-se que as células tumorais são mais sensíveis aos quimioterápicos quando estão em processo de divisão acelerado. Isto caracteriza normalmente os estágios iniciais da carcinogênese. Os regimes padrões de quimioterapia normalmente são aplicados com intervalos de 3 ou 4 semanas entre as doses de medicamentos, com o objetivo de permitir com que as células saudáveis do corpo, que também sofreram os efeitos da droga quimioterápica, tenham tempo para se recuperar entre esses ciclos. No entanto, cada vez mais tem se discutido sobre a possibilidade de as pequenas células tumorais que não tenham sido bem atingidas com a quimioterapia proliferarem mais rápido neste intervalo de 3 a 4 semanas (ONCOLINK, 2019). Este é o conceito conhecido como hipótese de Norton-Simon, a qual diz que a taxa ou velocidade com que as células tumorais respondem durante o tratamento é diretamente proporcional à taxa de crescimento nos intervalos, onde estas células não estão mais expostas às drogas (SIMON; NORTON, 2006). Ou seja, quanto mais rápido as células respondem ao tratamento, existe a chance das que não responderam crescerem e se multiplicarem mais rápido também nos intervalos da quimioterapia.

Sendo assim, o regime chamado quimioterapia de dose-densa passou ser utilizado em alguns casos, a fim de diminuir este intervalo entre as aplicações quimioterápicas. Este protocolo tem como objetivo atingir e eliminar o maior número de células tumorais possíveis, aumentando a taxa de alcance dos quimioterápicos utilizados. Para isso são administrados ciclos de quimioterapia com intervalos de 2 semanas entre cada aplicação, sendo que a dose é sempre a mesma (CITRON et al., 2003; LÓPEZ et al., 2017; MIRZAEI et al., 2013; ONCOLINK, 2019).

No caso do regime de dose-densa ACT, além do uso da combinação dos quimioterápicos que já foi descrita em protocolos tradicionais de quimioterapia, os ciclos são mais frequentes. Inicialmente são aplicados quatro ciclos de DOX combinada com ciclofosfamida com intervalos de 14 dias entre cada ciclo. A seguir são realizados mais quatro ciclos de PCTX, respeitando o mesmo intervalo de 14 dias entre os ciclos. Totalizando ao final 8 ciclos de quimioterapia com intervalos de 14 dias entre cada aplicação, sendo divididos em duas fases: primeiros quatro ciclos AC (adriamicina + ciclofosfamida), e últimos quatro ciclos usando T (taxol) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; MIRZAEI et al., 2013; NETO, 2013; ONCOLINK, 2019). Conforme já detalhado anteriormente, a DOX exerce sua citotoxicidade atuando como agente intercalante do DNA, e principalmente pela inibição da TOP2. Já o PCTX tem como mecanismo de ação mais consolidado a inibição da dinâmica normal de reorganização de microtúbulos, que é essencial para diversas funções celulares, gerando parada mitótica, colapso celular e encaminhando a célula à morte. Além disso, outro mecanismo, menos descrito, que promove a morte celular mediada por PCTX é a não-segregação cromossômica (WEAVER, 2014).

No entanto, apesar da existência de diferentes protocolos e regimes terapêuticos que parecem cada vez mais promissores, como o regime de dose-densa, ainda prevalecem altas as taxas de recorrências por falta de resposta aos tratamentos, e até mesmo de morte em decorrência do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

### **1.3 Heterogeneidade Tumoral e Resistência à Quimioterapia**

Grande parte da falta de resposta aos protocolos quimioterápicos está relacionada ao fenômeno de heterogeneidade tumoral. Estas características podem ser oriundas de alterações genéticas, epigenéticas, transcricionais e/ou fenotípicas, ocorrendo tanto entre tumores de diferentes pacientes com o mesmo tipo histológico tumoral (heterogeneidade intertumoral), quanto na população de células de um único tumor (heterogeneidade intratumoral). Essa variedade de perfil é um fator que prejudica o sucesso de terapias, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Além disso, conforme já mencionado, a quimioterapia tem como um de seus mecanismos de ação a adição de lesões no DNA, podendo, deste modo, levar a introdução de novas mutações aleatórias, tornando a massa tumoral mais heterogênea e com novos subclones mais ou menos resistentes à terapia aplicada (DAGOGO-JACK; SHAW, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MCGRANAHAN; SWANTON, 2017). Essa heterogeneidade presente nos subclones do tumor pode agregar vantagens seletivas positivas para o crescimento tumoral, alterando vias essenciais para a homeostase celular e acumulando mais características consideradas como *hallmarks* do câncer, como a evasão da apoptose, o descontrole da divisão celular e o aumento de proteínas sinalizadoras e reparadoras de dano no DNA, culminando com a proliferação e viabilidade da célula tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Embora muitos tumores sejam inicialmente sensíveis aos quimioterápicos, com o tempo podem desenvolver resistência por diferentes mecanismos (HOUSMAN et al., 2014). A resistência tumoral à quimioterapia, portanto, pode ser dividida em duas classificações: intrínseca e adquirida. A

resistência intrínseca acontece quando os fatores que conferem esta característica de resistência já existem nas células tumorais antes mesmo destas serem expostas ao tratamento quimioterápico. Já a resistência adquirida é desenvolvida durante o tratamento de tumores que inicialmente demonstravam-se sensíveis aos quimioterápicos, podendo ser através de mutações adquiridas ao longo deste tratamento, bem como por meio de diversas outras respostas adaptativas das células tumorais (HOLOHAN et al., 2013; RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013).

As células cancerígenas podem se tornar resistentes a uma única droga quimioterápica ou a uma classe de drogas com mecanismos de ação similares, através da alteração dos alvos celulares ou por aumento do reparo das lesões induzidas pelas drogas, que geralmente atingem o DNA. Após o fenômeno de seleção para a resistência a uma única droga, as células podem ainda apresentar uma resistência cruzada a outras drogas com estruturas diferentes e mecanismos de ação não relacionados; a este fenômeno denomina-se Resistência a Múltiplas Drogas (*Multidrug Resistance - MDR*). Isto pode explicar o porquê de alguns regimes de tratamento que combinam múltiplos agentes com diferentes alvos não apresentarem, muitas vezes, uma resposta satisfatória (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; SZAKÁCS et al., 2006).

Existem algumas características (representadas na figura 3) apontadas como principais na mediação da MDR, tais como: transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzima-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose (HOLOHAN et al., 2013; HOUSMAN et al., 2014; RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013). Destas, a mais estudada atualmente é o transporte da droga através da

membrana plasmática, no entanto, o aumento da reparação de danos no DNA também é um importante alvo de estudo, uma vez que uma grande parte dos quimioterápicos citotóxicos tem como alvo o DNA (HOUSMAN et al., 2014).

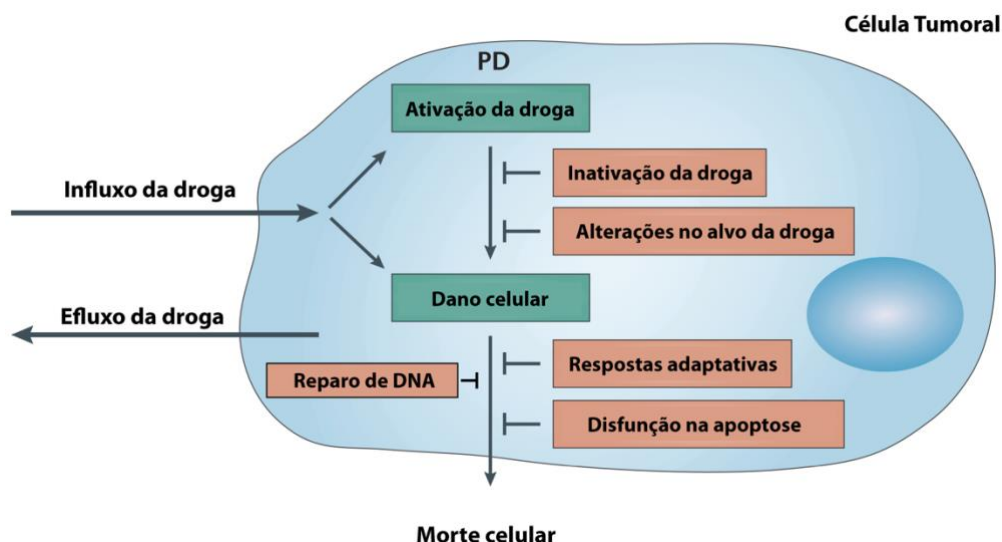


Figura 3: Principais mecanismos de resistência tumoral aos quimioterápicos. Nas células tumorais, a atividade antitumoral de uma droga pode ser limitada devido a mecanismos como influxo diminuído ou efluxo excessivo do fármaco; inativação ou perda de ativação da droga; alterações nos níveis de expressão de alvos da droga; ativação de respostas adaptativas; diminuição da morte celular devido à disfunção nos processos apoptóticos ou aumento nos mecanismos de reparo dos danos ao DNA. Fonte: (ROCHA, 2016) - Adaptado de Holohan et al., 2013.

A alteração no acúmulo intracelular dos quimioterápicos nas células pelo aumento do efluxo por proteínas da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) é um dos principais mecanismos de resistência tumoral estudados. Três transportadores ABC estão associados a cânceres resistentes à drogas: MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*). Estas proteínas possuem uma ampla especificidade de substratos, sendo capazes de aumentar o efluxo de várias drogas, como alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas, antraciclinas, taxanos e inibidores de kinases (HOUSMAN et al., 2014).

Além disso, o metabolismo dos fármacos pode ser alterado através de inativação ou falha na ativação das drogas. Drogas platinadas podem ser inativadas por tióis e glutatona, enquanto antimetabólitos como 5-fluoruracil e metotrexato podem não ser convertidos a seus metabólitos mais ativos caso a atividade das enzimas relevantes esteja ausente (HOLOHAN et al., 2013). Os alvos moleculares das drogas também podem sofrer modificações através de mutações ou alterações nos níveis de expressão, levando ao perfil de resistência. Alterações que ocasionam diminuição nos níveis da TOP2 são frequentemente associados à resistência aos inibidores desta enzima, uma vez que menos complexos Top2ccs serão formados, gerando, por consequência, menor morte celular. Outro exemplo é o receptor de androgênio, que se encontra em maior número em boa parte dos tumores de próstata, de modo que os inibidores destes receptores não conseguem inibir todas as moléculas alvo presentes, tornando estes tumores resistentes (HOUSMAN et al., 2014).

As células tumorais carregam muitas vezes alterações que resultam em um descontrole da sinalização apoptótica, a qual facilita o desenvolvimento tumoral e as metástases. Mutações, amplificações, translocações gênicas e superexpressão dos genes codificantes de proteínas anti-apoptóticas, como os membros da família BCL-2, as proteínas inibidoras de apoptose, assim como a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas, estão frequentemente associadas a várias malignidades e ligadas a resistência à quimioterapia e terapias alvo-específico (HASSAN et al., 2014).

Diversos agentes utilizados no tratamento do câncer agem através da geração de danos ao DNA que levam a morte celular diretamente ou após o processamento das lesões. A eficácia destes agentes pode ser influenciada pela

capacidade das células em reparar estes danos ao DNA, com o aumento da atividade das vias de reparo frequentemente levando a resistência tumoral (HELLEDAY et al., 2008). Drogas inibidoras destas vias de reparo ou da resposta aos danos ao DNA (*DNA Damage Response – DDR*) têm potencial para sensibilizar estas células, enquanto vias perdidas ou alteradas em alguns tumores podem ser exploradas, utilizando drogas que induzem lesões específicas que não serão reparadas, tornando-se assim mais citotóxicas e causando mais dano ao DNA destas células (CURTIN, 2012). Além disso, células tumorais frequentemente apresentam disfunção em alguma via de reparo, o que pode levar a uma completa dependência de uma via alternativa que é funcionalmente redundante em células normais, e pode ser inibida a fim de induzir morte celular específica das células tumorais (HOLOHAN et al., 2013).

#### ***1.4 Mecanismos de Reparo de DNA***

Diariamente, nosso organismo está exposto a uma série de agentes que induzem lesões na molécula de DNA, sejam elas geradas por processos endógenos ou por agentes exógenos. O próprio metabolismo celular gera ERO, que podem oxidar bases do DNA e gerar quebras de cadeia, por exemplo. Além disso, erros no processo de replicação podem resultar na incorporação errônea de bases na síntese das novas fitas, gerando assim mutações. Considerando todas as fontes endógenas de danos ao DNA, estima-se que cada célula está sujeita a até  $10^5$  lesões espontâneas no DNA por dia (HOEIJMAKERS, 2009). Da mesma forma, agentes exógenos de origem química ou física também são capazes de induzir diferentes lesões no nosso DNA. Alguns exemplos de agentes físicos são a radiação ultravioleta da luz solar, a qual também é capaz

de induzir até  $10^5$  lesões do tipo dímeros de pirimidinas e 6-4 fotoprodutos por célula a cada dia, e a radiação ionizante, utilizada principalmente na medicina em tratamentos com radioterapia ou exames de raio-X, que também induz a oxidação de bases do DNA levando à formação de quebras simples e duplas na sua estrutura (CICCIA; ELLEDGE, 2010; DERKS; HOEIJMAKERS; POTHOF, 2014; HOEIJMAKERS, 2009).

Com relação aos agentes exógenos de origem química pode-se citar a fumaça do cigarro, que causa uma ampla variedade de adutos e danos oxidativos no pulmão entre outros tecidos. Além disso, uma especial atenção deve ser dada aos quimioterápicos, que também são uma importante fonte exógena de geração de danos no DNA, uma vez que, conforme apresentado na sessão anterior, muitos deles tem como seu principal mecanismo de ação a interação com esta molécula a fim de gerar danos que possam levar a célula tumoral à morte. Diferentes quimioterápicos geram diferentes lesões no DNA, tais como alquilação de bases, formação de pontes inter e intracadeias, e, por fim, a formação das lesões consideradas as mais tóxicas à molécula de DNA, que são as quebras simples e duplas (CICCIA; ELLEDGE, 2010; HOEIJMAKERS, 2009).

Para enfrentar os diferentes tipos de danos ao DNA, diversos mecanismos de reparo estão envolvidos, atuando sobre os tipos específicos de lesões (figura 4). O reparo do DNA é um processo bioquimicamente complexo, que envolve inúmeras proteínas, formando complexos proteicos que serão utilizados de acordo com a natureza do dano ou sua extensão. Porém, conforme citado anteriormente, as vias de reparo de DNA podem alterar a eficácia do tratamento do câncer, uma vez que a remoção das lesões no DNA antes destas tornarem-



se tóxicas pode reduzir a toxicidade dos antineoplásicos (HELLEDAY et al., 2008).

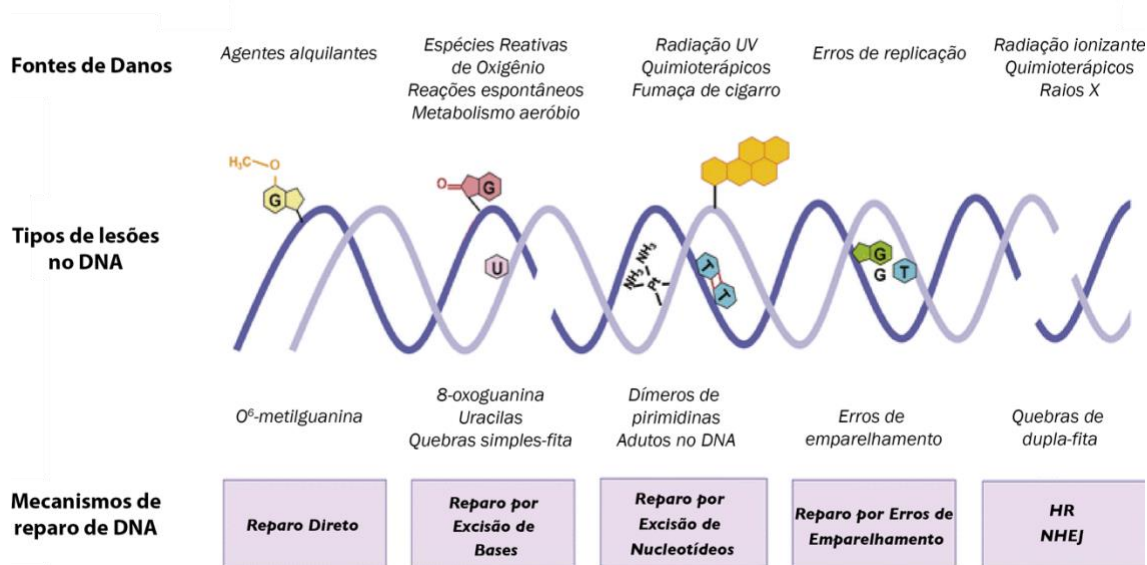


Figura 4: Representação das diferentes fontes de danos ao DNA, endógenas ou exógenas, gerando danos das mais diversas naturezas químicas e físicas, que são reparados por diferentes vias de reparo. Cada via reconhece alguns tipos específicos de lesões e atua por mecanismos distintos com o objetivo de remover a lesão do DNA. Algumas vias são consideradas livres de erro, pois mantêm mais a fidelidade da sequência original do DNA no momento do reparo do que outras. Fonte: Adaptado de (SOTTILE; NADIN, 2018).

A seguir serão detalhados dois importantes mecanismos de reparo de danos no DNA, os quais foram objetos de estudo nesta tese. O reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair* - NER) e as vias de reparo de quebras duplas no DNA.

#### 1.4.1 Reparo por excisão de nucleotídeos

Dentre as vias de reparação do DNA, a via NER é uma das mais versáteis, estando envolvida na remoção de lesões que levam a distorções estruturais importantes na cadeia do DNA, e que acabam impedindo o pareamento correto das bases ou bloqueando a replicação e a transcrição. Estas lesões incluem

adutos volumosos, como os já mencionados 6-4 fotoprodutos e os dímeros de pirimidina, os quais são gerados pela radiação ultravioleta. Além destas lesões, inúmeros adutos químicos induzidos por mutágenos ambientais ou quimioterápicos, pontes intra e intercadeias causadas por drogas como cisplatina, bem como lesões do tipo ciclopurinas geradas por ERO também podem ser reparadas pela via NER (MARTEIJN et al., 2014; MENCK; MUNFORD, 2014; SARASIN; STARY, 2007; SPIVAK, 2015). O que garante essa característica de ser tão versátil é o fato das enzimas sensoras de dano da via NER não focarem na lesão “*per se*”, mas sim na considerável distorção na dupla-hélice de DNA que é gerada em decorrência dessa lesão. É por isso que pode-se dizer que o NER repara uma variedade de lesões com diferentes características químicas em sua estrutura, mas que têm em comum o fato de desestruturarem o dúplice de DNA, formando grandes adutos agregados à sua estrutura (LIAKOS; LAVIGNE; FOUSTERI, 2017).

O NER é um sistema bastante conservado nos organismos eucarióticos, desde a levedura *S. cerevisiae* até células de mamíferos. Trata-se de uma via coordenada pela ação de cerca de 30 proteínas, sendo que, em humanos, as deficiências em pelo menos uma entre dez destas proteínas estão diferentemente associadas a desordens genéticas conhecidas como *Xeroderma pigmentosum* (XP), Síndrome de Cockayne (*Cockayne's Syndrome* - CS) e Tricotiodistrofia (TTD). As manifestações clínicas destas doenças diferem significativamente, incluindo dois fenótipos bem distintos, como a elevada predisposição ao câncer de pele para os pacientes XP, ou a progeria, sem aumento da incidência de câncer para os pacientes CS e TTD. A característica comum a todos estes pacientes é a fotossensibilidade, que pode ser manifestada

em diferentes níveis (MARTEIJN et al., 2014; MENCK; MUNFORD, 2014).

De uma maneira geral, os passos da via NER incluem o reconhecimento de uma distorção estrutural ou alteração química no DNA; verificação do dano e montagem de um complexo pré-incisão; incisões na cadeia danificada em cada lado da lesão; remoção da região de nucleotídeos contendo a lesão; ressíntese da sequência excisada utilizando a cadeia complementar como molde; e, finalmente, ligação do fragmento recém sintetizado à cadeia pré-existente (figura 5).

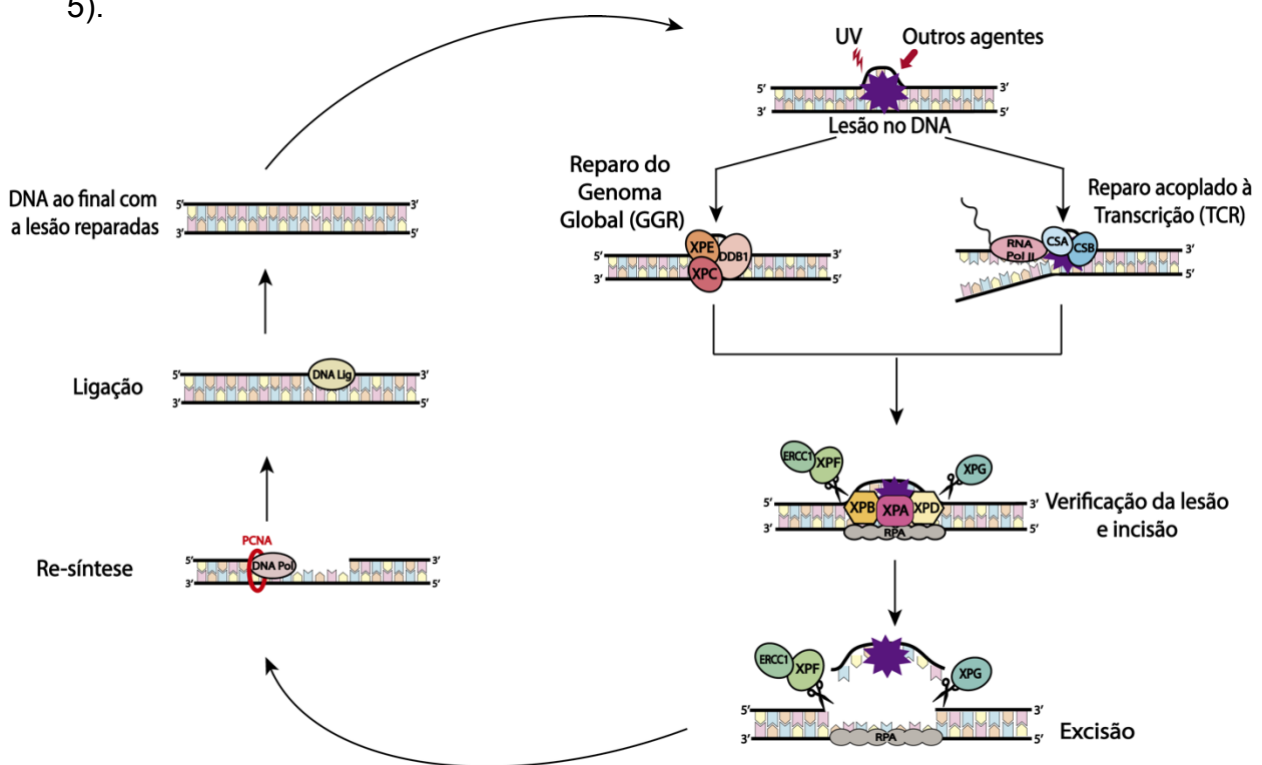


Figura 5: Representação resumida dos eventos da via NER, desde a indução da lesão ao DNA por diferentes agentes, reconhecimento desta lesão, verificação, excisão da porção de DNA contendo a mesma e re-síntese da nova fita com a sequência de DNA correta, liberando ao fim uma molécula de DNA intacta. Fonte: desenvolvido pela própria autora.

Conforme representado na figura 4, em termos de reconhecimento das lesões, o NER pode ser dividido em duas subvias: o reparo do genoma global (*Global Genome Repair* - GGR), que ocorre em todas as regiões do genoma, independente da transcrição, e o reparo acoplado à transcrição (*Transcription*

*Coupled Repair - TCR*), que ocorre apenas nas regiões transcritas de genes ativos. Ambas as subvias diferem apenas na etapa de reconhecimento da lesão do DNA, e convergem então para uma via em comum de incisão/excisão e correção dos danos gerados e subsequente ligação da fita de DNA (KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012; MARTEIJN et al., 2014; MENCK; MUNFORD, 2014; SARASIN; STARY, 2007; WOOD, 2010).

#### *1.4.1.1 Reconhecimento das lesões via GGR*

A subvia GGR reconhece lesões no DNA do genoma como um todo, no entanto, sua cinética de reparo pode ser influenciada por diversos parâmetros relacionados à estrutura da lesão e configuração da cromatina. Nesta etapa são necessárias proteínas específicas para o reconhecimento destas lesões, sendo assim, é uma etapa limitante para a velocidade do reparo como um todo. Isto porque a força de ligação destas proteínas de reconhecimento do dano depende da estrutura química da lesão, bem como do modo com o qual estas interferem na estrutura da dupla hélice (HANAWALT; FORD; LLOYD, 2003).

O complexo sensor das distorções no DNA na subvia GGR é composto pelas proteínas XPC (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*), HR23B (também conhecida como RAD23B) e centrin-2. A XPC é uma proteína de ligação ao DNA com forte preferência por DNA não danificado, ligando preferencialmente à sequência de DNA de cadeia simples que ocorre na cadeia não danificada, oposta à cadeia deslocada contendo a lesão, tendo assim um papel fundamental como sensor das lesões no complexo (MENCK; MUNFORD, 2014). Além disso, XPC é poliubiquitinada após dano no DNA, em um processo reversível, que não resulta na sua degradação, mas aumenta sua afinidade pelo

DNA. Para algumas lesões, como as induzidas por UV, notavelmente dímeros de pirimidinas, ainda é necessária a participação das proteínas UV-DDB (*UV-damaged-DNA-binding protein*), as quais consistem de duas unidades: DDB1 e DDB2 (também chamada XPE – *Xeroderma pigmentosum complementation group E*). Após a ligação deste complexo ao dano, ocorre o recrutamento das demais proteínas, que são comuns as duas sub-vias do NER (HANAWALT; FORD; LLOYD, 2003; KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012; LIAKOS; LAVIGNE; FOUSTERI, 2017; MENCK; MUNFORD, 2014)

#### 1.4.1.2 Reconhecimento das lesões via TCR

No reconhecimento via TCR, ocorre uma parada da RNA Pol II no processo de transcrição ao encontrar uma porção do DNA com uma grande distorção em decorrência da lesão. A parada da maquinaria de transcrição em função de danos no DNA afeta severamente as funções celulares e a sobrevivência, inibindo a produção de transcritos essenciais, bloqueando a replicação e sinalizando vias de morte celular. Por outro lado, caso a RNA pol II consiga ultrapassar estas lesões, podem ser gerados transcritos com mutações, deletérias para a célula (SPIVAK, 2015).

O bloqueio da RNA Pol II ao encontrar obstáculos para o progresso da transcrição é o passo inicial do TCR. A proteína CSB (*Cockayne Syndrome complementation group B*) interage fracamente com a RNA Pol II e estimula a transcrição, mas se torna mais fortemente ligada quando ocorre a sua parada. CSB é uma proteína de 168 kDa, membro da família de proteínas SNF2 de ATPases dependentes de DNA (envolvidas em remodelamento da cromatina), que modifica a conformação do DNA, alterando a interface entre a RNA Pol II e

o DNA, sendo considerada o principal regulador do TCR. CSB recruta a proteína CSA (*Cockayne Syndrome complementation group A*) para a matriz nuclear após o dano no DNA. CSA é uma proteína de 44 kDa, parte do complexo E3-ubiquitina ligase, necessária para estabilização da CSB, e juntamente com a mesma, faz o recrutamento das proteínas HMGN1 (*High mobility group nucleosome binding domain 1*), XAB2 (*XPA binding protein 2*) e TFIIIS (*Transcription factor II-S*) para o local do dano. A interação específica de XAB2 com a proteína XPA (*Xeroderma pigmentosum complementation group A*), que é essencial para ambas as subvias TCR e GGR, sugere que esta possa ser a proteína chave na junção das duas subvias, para a qual todos os passos subsequentes são compartilhados (COSTA, 2003; HANAWALT; SPIVAK, 2008; KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012; SPIVAK, 2015; STEURER; MARTEIJN, 2017).

#### 1.4.1.3 Verificação e excisão da lesão e re-síntese da nova porção

A partir da etapa de reconhecimento, as subvias convergem para uma via em comum. Nesta etapa ocorre então a montagem de um complexo proteico para a verificação do dano e preparo do local contendo a lesão para a incisão da mesma. Inicialmente é recrutado o fator de transcrição TFIIH, o qual é um complexo composto de dez subunidades, sendo que entre seus componentes estão as helicases e DNA-dependente ATPases XPB e XPD (*Xeroderma pigmentosum complementation group B e D*). As proteínas XPB e XPD têm funções complementares: enquanto XPB desenrola o DNA na direção 3' - 5', XPD atua na direção contrária, ocasionando a abertura da região ao redor da lesão. XPB e XPD ainda fazem uma melhor verificação do dano a fim de

determinar qual cadeia do DNA contém a lesão (COSTA, 2003; SCHÄRER, 2013).

Além destas, as proteínas XPA e RPA podem estar presentes antes ou após o recrutamento de TFIIH. Estas proteínas atuam na checagem da lesão, na proteção do DNA de fita simples e na estabilização do complexo pré-incisão, servindo como subunidades regulatórias que verificam o recrutamento das demais proteínas, bem como a correta montagem dos intermediários da etapa de incisão. A proteção da cadeia não danificada pela ação da proteína RPA é fundamental, garantindo que a incisão seja feita apenas na cadeia contendo o dano.

A endonuclease XPG (*Xeroderma pigmentosum complementation group G*) é recrutada através da sua interação com TFIIH. Na verdade, XPG parece estar constitutivamente associada ao TFIIH para alguns de seus papéis a nível de fator de transcrição. No entanto, na via NER XPG tem um papel inicialmente estrutural, interagindo com TFIIH para a completa montagem do complexo pré-incisão (SCHÄRER, 2013). O recrutamento das proteínas XPF-ERCC1 (*Xeroderma pigmentosum complementation group F – Excision Repair Cross-complementing-1*), através da interação com a proteína XPA, finaliza então a montagem do complexo pré-incisão (COSTA, 2003; KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012; SCHÄRER, 2013; SPIVAK, 2015; STEURER; MARTEIJN, 2017). A primeira incisão na fita de DNA contendo a lesão é feita por XPF-ERCC1 a 5' da lesão, ativando assim a atividade de endonuclease de XPG para a incisão a 3' da lesão logo em seguida. Desta forma uma porção de aproximadamente 25 a 30 nucleotídeos contendo a lesão são excisados. Este

mecanismo é bastante controlado, a fim de garantir que o intervalo entre as duas incisões na fita de DNA não persista por muito tempo.

A incisão feita por XPF-ERCC1 gera extremidades 3' com grupos hidroxila livres, os quais são usados pela maquinaria de replicação para iniciar a síntese da nova fita com o dano reparado. Esta síntese é feita pela ação das proteínas de replicação PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), RFC (*Replication Factor C*), RPA e as DNA polimerases (DNA Pol  $\delta$ ,  $\epsilon$  e/ou  $\kappa$ ). A partir da síntese, ocorre a ligação dos fragmentos pelas DNA ligases I ou XRCC1-DNA ligase III. As ligases conseguem completar o processo uma vez que anteriormente, quando houve a incisão a 5' pela endonuclease XPG, foram geradas extremidades livres 5' fosfato, as quais são agora, ao final do processo, utilizadas pelas DNA ligases para a finalização do reparo. As proteínas exatas envolvidas nestas etapas dependem do estado proliferativo das células. DNA Pol  $\epsilon$  e DNA ligase I atuam principalmente em células que estão em replicação ativa, enquanto DNA Pol  $\delta$  ou  $\kappa$  e XRCC1-DNA ligase III atuam principalmente em células em estado não replicativo, onde tanto a concentração de nucleotídeos quanto a expressão da DNA ligase I, são baixas (SCHÄRER, 2013; SPIVAK, 2015; STEURER; MARTEIJN, 2017).

#### 1.4.2 Mecanismos de reparo de quebras duplas no DNA

As quebras duplas no DNA (*Double Strand Breaks – DSBs*) são consideradas as lesões mais críticas, uma vez que se não reparadas de maneira correta podem causar mutações severas, como deleções ou translocações cromossômicas. Nas células eucarióticas existem quatro vias conservadas para reparar estas lesões, são elas: junção de extremidades não homólogas



(*nonhomologous DNA end joining - NHEJ*), junção alternativa de extremidades não homólogas (*alternate nonhomologous DNA end joining – alt-NHEJ*), recombinação homóloga (*homologous recombination - HR*) e anelamento de simples fita (*single-strand annealing - SSA*); sendo as mais frequentemente usadas as vias NHEJ e HR. Para que o reparo das DSBs ocorra de maneira precisa, a via de reparo considerada ótima em cada circunstância deve ser ativada, e as células apresentam diferentes mecanismos que influenciam nessa escolha (SHIBATA, 2017; SUNG, 2018).

Há trabalhos que indicam que a via NHEJ seria a primeira tentativa de reparo de uma DSB. Além disso, acredita-se que o reparo por NHEJ representa 75% dos eventos de reparo de DSBs e que é mais rápido do que por HR, durando em média 30 minutos *versus* horas, respectivamente (MAO et al., 2008). Se NHEJ não consegue ser completo, devido à diferentes fatores que influenciam nesta escolha, a DSB é submetida à uma ressecção, onde uma das fitas do dúplex de DNA é degradada para gerar uma extremidade de DNA simples-fita que é importante para a conclusão de outras vias de reparo, como a HR (HER; BUNTING, 2018; MAO et al., 2008; SHAHAR et al., 2012). De maneira geral, esta etapa inicial de ressecção é fundamental para determinar o destino do reparo das DSBs.

#### *1.4.2.1 Reparo de DSBs via NHEJ*

A via NHEJ é considerada uma via “*error-prone*”, uma vez que, de maneira geral, apenas faz a junção das extremidades da quebra dupla, podendo assim perder informações gênicas. O processo se inicia com o rápido reconhecimento e recrutamento do heterodímero Ku70/80 para a quebra no DNA, com o objetivo de proteger estas extremidades para que não sofram ressecção por

endonucleases da via HR. Quando Ku já está ligado à DSB, ocorre também o recrutamento de DNA-PK, que é uma kinase que fosforila a si mesma e também à outras proteínas da via NHEJ, como por exemplo Artemis, a fim de promover a continuação do reparo. Ku também recruta diretamente, de forma independente de DNA-PK, um complexo composto pelas proteínas XRCC4 e LIG4, que promovem a ligação das extremidades da quebra ao final da via. Em muitos casos, as terminações da quebra dupla não estão na configuração ideal para que ocorra a ligação direta. Extremidades 5'-OH e 3' fosfato devem ser covalentemente modificadas a fim de gerar as chamadas “*overhangs*”, que são regiões da fita de DNA com saliências devido a um processo de ressecção em uma das fitas. Neste caso, apesar de se tratar da via NHEJ, ainda assim deve ocorrer uma pequena ressecção que deve ser preenchida para que a ligação final das extremidades seja concluída. Alguns fatores importantes neste processo, que atuam desde processando as extremidades até removendo estes resíduos de 5'-OH ou 3' fosfato que poderiam impedir a ligação, bem como sítios abásicos próximos da região, são o próprio complexo Ku e as proteínas PNPk, Artemis e WRN (LIU et al., 2014).

Alguns fatores que não fazem parte da via NHEJ diretamente também podem estar relacionados com a promoção do reparo por esta via, ou com a inibição indireta da via HR. Alguns deles são por exemplo as proteínas RIF1 e 53BP1, que funcionam inibindo a etapa inicial de ressecção das extremidades da DSB, a qual é essencial para o desencadeamento da HR, conforme será apresentado a seguir.

#### 1.4.2.2 *Reparo de DSBs via HR*

O reparo de quebras duplas mediado pela via HR se inicia com o reconhecimento e ligação às extremidades das DSBs pelo complexo MRN. Este complexo é composto pelas proteínas MRE11-RAD50-NBS1, sendo que é MRE11 quem apresenta as atividades de exo e endonuclease, essenciais para que ocorra a ressecção das extremidades das DSBs. A presença de MRN recruta outras proteínas sinalizadoras, como ATM que é uma quinase que fosforila diferentes substratos na cascata de sinalização, bem como a si mesma. Quando autofosforilada, ATM fosforila também um importante sinalizador de quebras duplas, a histona H2AX, formando  $\gamma$ H2AX.  $\gamma$ H2AX atua como uma plataforma âncora para os fatores subsequentes da via HR, e é considerada como um marcador inicial na sinalização de DSBs (LIU et al., 2014).

Dando sequência ao processo de ressecção, a proteína CtIP estimula a atividade de endonuclease da MRE11, a fim de gerar a clivagem das terminações 5' em ambos os lados das quebras. Isto permite também que as nucleases Exo1 e Dna2 se liguem à região e promovam uma ressecção mais longa na direção 5' – 3' (GOBBINI et al., 2018; MYLER et al., 2017).

Uma importante proteína na via HR é BRCA1 (*Breast and ovarian cancer type 1*), bastante conhecida por seu papel como supressor tumoral e no controle de sinalização e reparo de quebras duplas (HUEN; SY; CHEN, 2010). Por muito tempo não estava claro em que momento da via HR BRCA1 estaria atuando. Hoje em dia já se demonstrou que BRCA1 apresenta-se em dois momentos. Inicialmente interagindo com CtIP, na etapa inicial de ressecção. Esta interação, apesar de não ser fundamental para o processo, acelera e facilita a ressecção das extremidades da quebra (ANDRÉ CRUZ-GARCÍA; LÓPEZ-SAAVE-DRA;

HUERTAS, 2014). Além disso, a presença de BRCA1 favorece HR e facilita a ressecção do DNA porque a mesma está também envolvida na remoção dos complexos de RIF1-53BP1, os quais inibem a ressecção e estimulam a via NHEJ. BRCA1 promove a de-fosforilação de 53BP1 e a consequente liberação de RIF1 da DSB na fase G2 do ciclo celular (CHAPMAN et al., 2012; ESCRIBANO-DÍAZ et al., 2013; ISONO et al., 2017). Além do seu envolvimento na etapa inicial da via HR, BRCA1 também é fundamental no recrutamento do complexo PALB2-BRCA2-RAD51 para as simples fitas que já sofreram ressecção, dando continuidade ao processo de reparo (LIU et al., 2014).

As extremidades 3' simples fita formadas pela ressecção do DNA são prontamente protegidas pela proteína RPA, a qual previne a formação de estruturas secundárias nessas regiões. A seguir, RPA logo é deslocada pela proteína RAD51. O recrutamento de RAD51 nesta etapa caracteriza um passo crítico na via HR, pois é formado um filamento de nucleoproteínas que vai invadir e procurar uma sequência de homologia no outro dúplex de DNA (normalmente a cromátide irmã) para ser usado como molde para o reparo. Como consequência disto se forma uma estrutura conhecida como D-loop, onde há o deslocamento da segunda fita da cromátide irmã e a invasão e pareamento da fita do dúplex inicial com a outra fita da cromátide homóloga (figura 6) (KREJCI et al., 2012; LIU et al., 2014; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

O recrutamento de RAD51 para a região de simples-fita é controlado por diferentes mecanismos. Um deles é pela interação com BRCA2, a qual facilita este processo superando o efeito inibitório da presença de RPA na região (KREJCI et al., 2012). Além disso, a ação orquestrada de diferentes proteínas como alguns parálogos de RAD51, RAD51B e RAD51C, também RAD52 e

RAD54, que garantem o correto posicionamento de RAD51 na região de simples fita para que ocorra a invasão na cromátide irmã em busca de uma região de homologia e formação do D-loop (KREJCI et al., 2012; LIU et al., 2014). Em seguida à formação deste D-loop, a extremidade 3' da fita que realizou a invasão serve como *primer* para iniciar a síntese da porção deletada. É feito então o alongamento desta fita usando como molde a fita do dúplex homólogo, a fim de copiar de maneira fiel todas as informações genéticas perdidas na quebra dupla. No entanto, para que esse alongamento aconteça os filamentos de RAD51 devem ser removidos por RAD54 e RAD54B (KREJCI et al., 2012; LIU et al., 2014; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

A maquinaria de replicação envolvida nesta etapa de síntese de DNA parece envolver diferentes DNA polimerases, como a Pol  $\delta$ ,  $\eta$  e  $\kappa$ . Além disso, o fator de processividade PCNA atua como um ponto regulatório no recrutamento das diferentes polimerases (LIU et al., 2014). A síntese pelas polimerases deve se estender o suficiente para que quando ocorra o rompimento da estrutura de D-loop a nova fita consiga anelar com a outra fita que havia sofrido ressecção inicialmente na quebra dupla, finalizando o processo (WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

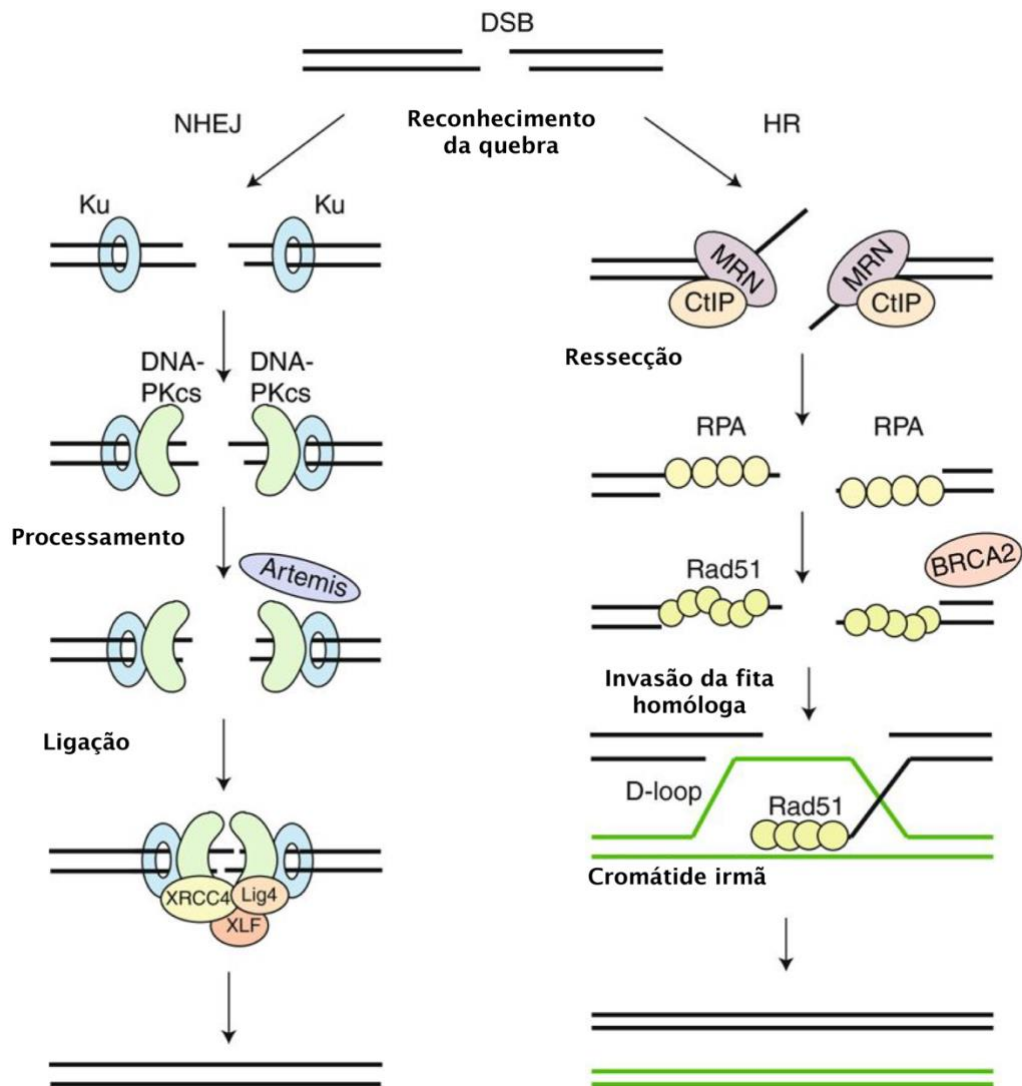


Figura 6: Representação das vias NHEJ e HR para reparo de quebras duplas no DNA. Fonte: adaptado de (BRANDSMA; VAN GENT, 2012).

Embora toda a cinética de sinalização das diferentes cascatas proteicas e a estrutura das terminações nas DSBs sejam importantes para determinar qual via entre NHEJ e HR será escolhida para reparar estas quebras, já está claro que um fator bastante importante nessa escolha é a fase do ciclo celular. Já se mostrou que o reparo por HR acontece principalmente durante a fase S

tardia/G2, enquanto NHEJ é predominante em fases G1, podendo atuar também em G2, no entanto está reprimido durante a meiose (HER; BUNTING, 2018). Por muito tempo se acreditou que o único motivo pelo qual ocorria essa diferenciação das vias nas fases do ciclo celular era a necessidade de um dúplex homólogo para a via HR, o qual só aconteceria após a replicação do DNA em fase S. Hoje em dia já se demonstrou mais detalhadamente que existe uma regulação bastante controlada que envolve ativação e desativação dos principais fatores reguladores de cada via nas diferentes fases. Por exemplo, o favorecimento de HR em S está não só relacionado à presença de um dúplex homólogo após a síntese, mas também ao fato de que nesta fase ocorre fosforilação do heterodímero Ku70/80. Quando fosforilado, Ku altera sua estrutura e reduz sua afinidade pelo DNA. Essa dissociação permite com que se inicie o mecanismo de ressecção do DNA, favorecendo a via HR na fase S (HER; BUNTING, 2018; LEE et al., 2016).

#### 1.4.3 Reparo das lesões induzidas por inibidores de TOP2

Os danos ao DNA induzidos por inibidores da TOP2 podem ser reparados por múltiplas vias. Considerando que estes danos incluem quebras de cadeia e proteínas ligadas covalentemente ao DNA (complexos Top2ccs), o reparo das lesões requer vias de reparo de DSB e outras vias específicas para remoção de adutos proteína-DNA (NITISS, 2009).

Conforme já foi detalhado na sessão 1.1.1.2, uma das principais lesões induzidas pelos inibidores da TOP2 são os complexos cliváveis no quais a enzima fica ligada covalentemente ao DNA. Uma maneira interessante de reparar esta lesão é a remoção direta da enzima através da clivagem da ligação

tirosina-fosfato que liga a TOP2 ao DNA, gerando extremidades livres que podem ser reparadas por mecanismos de reparo de quebras no DNA (NITISS; NITISS, 2013). A remoção da TOP2 ligada ao DNA é feita pela enzima TDP2, e isto define um importante mecanismo pelo qual o reparo dos complexos TOP2-DNA é feito. A enzima é capaz de remover principalmente os peptídeos ligados às extremidades 5' via ligações do tipo fosfotirosil, bem como, de maneira mais fraca, também cliva ligações na extremidade 3'. Desta forma, são geradas DSBs com extremidades 5'OH limpas, que estariam prontas para junção direta via NHEJ. Entretanto, a remoção nucleolítica da enzima também pode ser realizada pela ação do complexo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) em colaboração com a proteína CtIP, sendo que, neste caso, provavelmente a atuação do complexo MRN poderia catalisar os produtos para o reparo via HR (NITISS; NITISS, 2013; POMMIER et al., 2014).

Trabalhos prévios do nosso grupo mostraram que existe um envolvimento da via NER na resposta às lesões induzidas por inibidores de TOP2 (ROCHA et al., 2016b; SAFFI et al., 2010). Encontramos, mais especificamente em resposta à MXT, uma diferença na sensibilidade a acúmulo dos complexos TOP2-DNA em células deficientes em CSB, em comparação às células deficientes em XPC ou proficientes em NER. Além disso, quando estas células foram complementadas com plasmídeos contendo a sequência de CSB a fim de restaurar sua função, a sensibilidade e o acúmulo dos complexos foi revertido, reafirmando o papel desta proteína na remoção ou processamento dos complexos Top2ccs, de uma maneira via NER canônica ou não (ROCHA et al., 2016b).



### **1.5 CSB x Reparo de DSBs x R-loops**

Além do papel clássico como proteína de reconhecimento de danos acoplados à transcrição na via NER, nos últimos anos alguns trabalhos vêm demonstrando novas funções para a proteína CSB. Já foi mostrado que também está envolvida na escolha da via de reparo de quebras duplas HR ou NHEJ. CSB parece remover histonas da região danificada da cromatina, restringindo o acesso de proteínas da via NHEJ, e favorecendo por consequência o acesso para via HR (BATENBURG et al., 2015, 2017).

Somado a isso, outros trabalhos têm apontado um possível papel de CSB na sinalização para o reparo de quebras duplas quando acontecem em regiões gênicas codificantes para genes ativamente transcritos, uma vez que são regiões de extrema importância no genoma (TENG et al., 2018; WEI et al., 2015; WEI; LEVINE; LAN, 2016). Nestes genes, a RNA Pol II, responsável pela síntese do RNA mensageiro (mRNA), é capaz de contornar lesões do tipo modificações de bases, como por exemplo 8-oxo-guanina, porém o mesmo não acontece frente a lesões do tipo quebras simples e duplas no DNA. Portanto, a parada da RNA Pol II devido à uma quebra na estrutura do DNA tem um grande impacto na sobrevivência celular e na manutenção da estabilidade genômica, indicando que quebras não reparadas em regiões transcricionalmente ativas podem ser ainda mais tóxicas para a célula do que em regiões inativas (NAKANISHI et al., 2012; WEI; LEVINE; LAN, 2016).

O reparo de quebras duplas em genes ativos parece ser mais rápido em comparação a quando os mesmos genes estão inativos ou mesmo a regiões constantemente inativas da eucromatina, sugerindo um mecanismo de reparo de quebras duplas acoplado à transcrição. No entanto, usar a via NHEJ para

reparar quebras nessas regiões codificantes seria prejudicial para a fidelidade da sequência. Sendo assim, semelhante ao TCR-NER, estudos recentes têm levantado evidências da existência de uma via HR acoplada à transcrição (*transcription coupled-HR - TC-HR*), a qual garantiria a manutenção da fidelidade das sequências ativas que sofreram quebras. Neste caso, é plausível que um mecanismo análogo atue para conectar o reconhecimento da lesão devido à parada da RNA Pol II com o recrutamento de fatores da HR (WEI; LEVINE; LAN, 2016).

Sabe-se que CSB pode apresentar funções de reparo acoplado à transcrição distintas conforme o tipo de lesão que ocasiona a parada na transcrição, como lesão induzida por radiação UV (substrato da via NER), mas também lesões do tipo quebras-duplas, uma vez que já foi demonstrado que células deficientes em CSB são sensíveis à radiação ionizante e tratamentos com inibidores de TOP2 (ambos conhecidos por gerar quebras duplas no DNA) (ROCHA et al., 2016b; ROPOLO et al., 2011)

Diferentes trabalhos mostraram que CSB parece ser essencial para o recrutamento de fatores importantes da via HR como RPA, RAD51 e RAD52, em lócus dependentes de transcrição ativa, mas que não estejam confinados apenas nas fases S/G2 do ciclo celular (TENG et al., 2018; WEI et al., 2015; WEI; LEVINE; LAN, 2016). No entanto o quanto este efeito é específico de CSB ou de outras proteínas da subvia TCR-NER ainda precisa ser melhor investigado. Como se sabe que o reparo por HR ocorre normalmente em S/G2, uma hipótese levantada na literatura seria a de que, nas células que se encontram em fase G1, o reparo por HR em genes ativamente transcritos poderia usar os transcritos de RNA como *templates* para manter a alta fidelidade e

eficiência do mecanismo de reparo de quebras duplas nessas regiões tão importantes do genoma (MCDEVITT et al., 2018; MEERS; KESKIN; STORICI, 2016; WEI; LEVINE; LAN, 2016).

Somado à isso, já se demonstrou que a ausência de CSB resulta em um acúmulo de R-loops, que são híbridos de DNA:RNA formados na bolha de transcrição com o mRNA e uma das fitas de DNA, mantendo a outra fita deslocada (SOLLIER et al., 2014; TENG et al., 2018; WEI et al., 2015). CSB parece estar envolvida na resolução destas estruturas, o que poderia explicar a importância dessa proteína no reconhecimento de lesões nas áreas de transcrição ativa, uma vez que atuaria removendo essas estruturas não canônicas do DNA (*Non B-DNA structures*), deixando o mRNA livre para servir como *template* para o acesso dos fatores da via HR, os quais também seriam dependentes de CSB para o seu recrutamento à quebra dupla nestes locais específicos (SOLLIER et al., 2014; TENG et al., 2018). Além disso, em relação aos R-loops, já foi demonstrado que essas estruturas são formadas em células tratadas com o inibidor de TOP1 Camptotecina (MANZO et al., 2018; SOLLIER et al., 2014). Considerando a importância das enzimas topoisomerases (1 e 2) na manutenção da topologia e estabilidade do DNA, pode-se imaginar que a sua ausência ou inibição favoreceria a formação dessas estruturas que geram instabilidade genômica, como os R-loops.

A melhor elucidação destes processos é importante para caracterizar mecanismos regulatórios específicos usados pelas células para proteger as regiões codificantes, de modo a maximizar o reparo fiel e livre de erros dos danos ao DNA nas mesmas. Sendo assim, uma das hipóteses levantadas neste trabalho é a de que o envolvimento de CSB na remoção dos complexos Top2ccs,

já confirmado em trabalho anterior do grupo, pode estar relacionado à formação de R-loops próximos ao complexo de TOP2-DNA. Sendo que a formação do complexo geraria a parada da RNA Pol II, favorecendo a formação dos híbridos de DNA:RNA na bolha de transcrição, e recrutando CSB para o local da parada da RNA Pol II para atuar no processamento ou remoção dos R-loops. Demonstrando assim, mais uma vez, a importância da via NER, ou de proteínas isoladas como a CSB, nas lesões induzidas por inibidores de TOP2, podendo a sua alteração modular a resposta a tratamentos quimioterápicos que utilizem fármacos desta classe.

## 2. OBJETIVOS

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

Investigar a influência da via NER a diferentes inibidores de Topoisomerase 2 em uma abordagem celular e molecular, explorando a mecânica e buscando entender a relação desta via com as lesões geradas no DNA por estas drogas.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

- Analisar a formação de quebras duplas induzidas por inibidores de TOP2 em células tumorais silenciadas para o gene CSB, bem como outros genes da via NER;
- Investigar a existência de uma interação entre as proteínas CSB e TOP2 antes e após os tratamentos com inibidores de Topo II;
- Analisar a formação de R-loops em resposta aos tratamentos com inibidores de TOP2, e determinar a influência de CSB e de TOP2 nesse mecanismo;
- Desenvolver uma abordagem de aplicação de um protocolo clínico de quimioterapia que utilize um inibidor de TOP2 em células tumorais *in vitro* e analisar a proliferação destas células durante e após o tratamento, bem como a modulação de genes de reparo, principalmente da via NER, em diferentes pontos do tratamento.

**3. Capítulo I: “Role of Nucleotide Excision Repair Proteins in Response to DNA Damage Induced by Topoisomerase II Inhibitors”**

Artigo de revisão publicado na revista *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*

## APRESENTAÇÃO

Neste Capítulo será apresentado um artigo de revisão publicado na revista *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, no qual dividi a autoria com a Dra. Jaqueline Cesar Rocha, sendo que o mesmo também foi apresentado na sua tese defendida em 2016 pelo PPGBCM da UFRGS. No artigo são descritos os principais mecanismos de reparo de danos ao DNA envolvidos na resposta a drogas inibidoras da Topoisomerase 2, com ênfase na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

O artigo faz uma descrição das enzimas topoisomerasas e seu mecanismo de ação, bem como das principais drogas inibidoras destas enzimas. Também são descritas as possíveis lesões induzidas pelos inibidores da Topoisomerase 2. Em seguida são relatados os mecanismos envolvidos no reparo destas lesões, no qual é descrita a participação das vias de reparo de quebras duplas (recombinação homóloga – HR – e junção de extremidades não homólogas – NHEJ). Porém, o enfoque principal deste artigo é a participação da via NER na remoção das lesões induzidas pelos inibidores da Topoisomerase 2.

Por fim, o artigo apresenta um modelo de como algumas lesões induzidas por estas drogas podem ser reparadas, destacando a participação da via NER na remoção de lesões do tipo adutos. No entanto, em relação à remoção dos complexos Topo 2-DNA, além das vias já conhecidas de reparo, também propomos a possível participação de algumas proteínas da via NER neste processo.



## Review

## Role of nucleotide excision repair proteins in response to DNA damage induced by topoisomerase II inhibitors

Jaqueline C. Rocha<sup>a,b,1</sup>, Franciele F. Busatto<sup>a,b,1</sup>, Temenouga N. Guecheva<sup>c</sup>, Jenifer Saffi<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>b</sup> Post-Graduation Program in Molecular and Cell Biology (PPGBCM), Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>c</sup> Department of Biophysics, Federal university of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 September 2015

Received in revised form 11 March 2016

Accepted 8 April 2016

Available online 19 April 2016

## Keywords:

DNA topoisomerases

Topoisomerase II inhibitors

DNA repair

NER

## ABSTRACT

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

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. DNA topoisomerases	69
2. Topoisomerase inhibitors	69
2.1. Topoisomerase I inhibitors	69
2.2. Topoisomerase II inhibitors	69
3. Topoisomerase II inhibitors versus DNA repair	71
4. Nucleotide excision repair	72
5. Topoisomerase II inhibitors versus nucleotide excision repair	73
6. Conclusions	74
Conflict of interest	75
Acknowledgements	76
References	76

\* Corresponding author at: Laboratory of Genetic Toxicology, Rua Sarmento Leite, 245, Anexo III, Bairro Centro, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.  
E-mail address: [jenifers@ufcspa.edu.br](mailto:jenifers@ufcspa.edu.br) (J. Saffi).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this review.



## 1. DNA topoisomerases

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

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

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

status in relation to the proliferation and dissociates from chromosomes during mitosis. This isoform cannot compensate for the loss of topo II $\alpha$  in mammalian cells, suggesting that both enzymes have their own and different roles [4,7,8].

## 2. Topoisomerase inhibitors

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

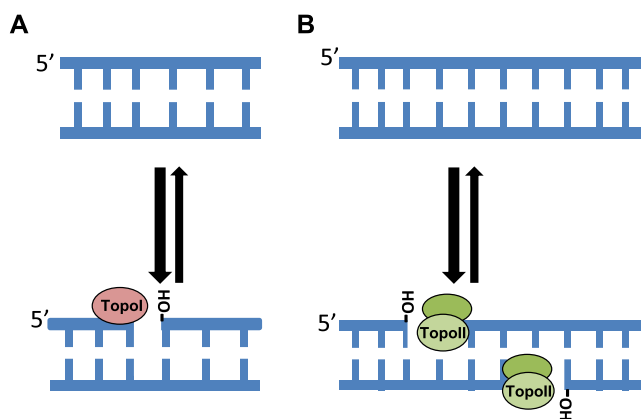
### 2.1. Topoisomerase I inhibitors

Camptothecin (CPT), an alkaloid isolated from the plant *Camptotheca acuminata* in the 1960s, was the first topo I inhibitor identified having antitumor properties, although its mechanism of action was only discovered about 20 years later [9]. There are now semi-synthetic derivatives of CPT approved by the FDA (Food and Drug Administration). Fig. 2A shows the structures of some topo I inhibitors and the presence of an  $\alpha$ -hydroxylactone E-ring. One of the CPT derivatives, topotecan, is already used in clinical routines, being prescribed for ovarian cancer and recurrent small cell lung cancer. Another FDA-approved CPT derivative is irinotecan, a prodrug that needs to be converted into its active metabolite SN-40, and is recommended mainly for gastrointestinal tumors. There are some common side effects of this drug, such as diarrhea, which can be severe, temporary liver dysfunction, and myelosuppression, which also occurs in topotecan treatment [1,9].

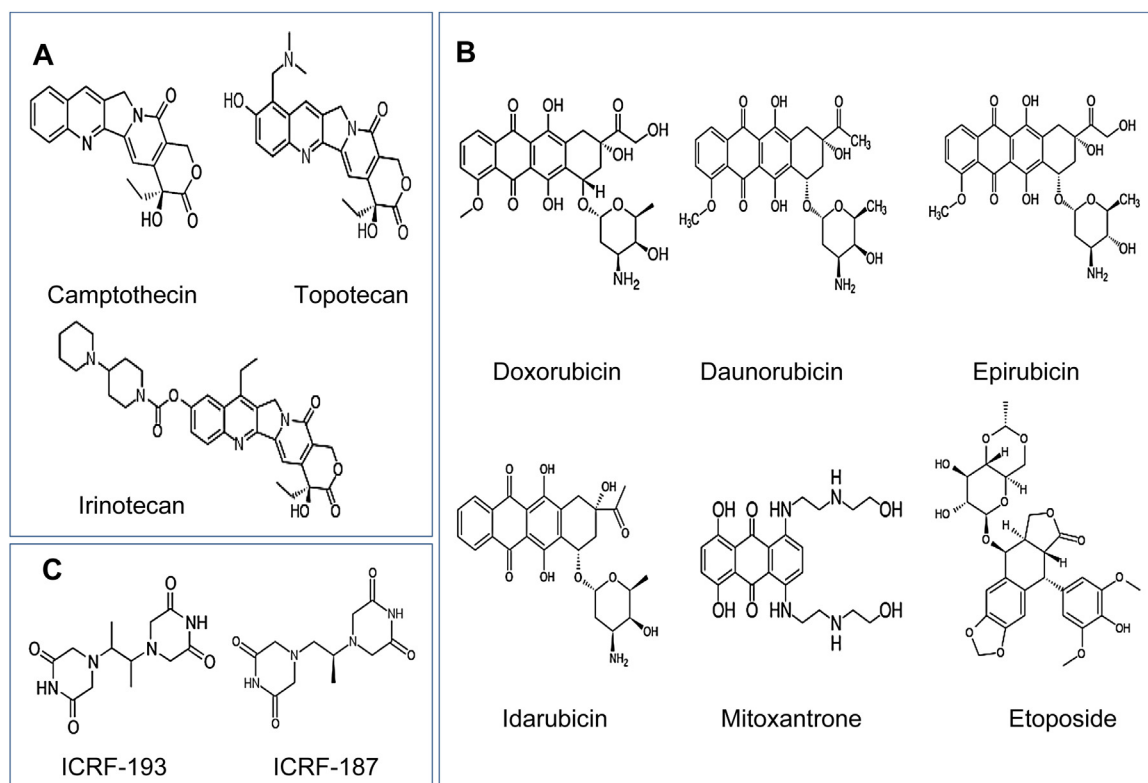
An important limitation in all CPT derivatives is that they are rapidly (within minutes) and spontaneously inactivated as a consequence of the E-ring opening, changing from the lactone form to the carboxylate form, which is favored by the physiological neutral pH. Moreover, this form tightly binds to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

### 2.2. Topoisomerase II inhibitors

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



**Fig. 1.** Different action mechanisms of topoisomerase I and II in the formation of DNA cleavage complexes. (A) Topoisomerase IB cleaves a single DNA strand forming a covalent complex at the 3'-end of the breaks. (B) The action of topoisomerase II in both DNA-strands, forming the covalent complexes at 5'-end of the breaks.



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

have the topoisomerase poisons, while in the second we have the catalytic inhibitors of topoisomerases [1,2].

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

Daunorubicin was the first anthracycline discovered, in the 1950s, from a bacteria *Streptomyces* and it is still used primarily for the treatment of acute leukemia. Doxorubicin (DOX) was also discovered in another bacteria toxin soon after Daunorubicin and it is now more widely used. It is recommended for the treatment of breast cancer, bone and soft tissue sarcoma, bladder cancer, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma [1,13]. In the case of the topo I inhibitor camptothecin, the effect of anthracyclines on topo II was demonstrated after their approval by the FDA as anticancer agent [1]. It had already been shown that at low doses DOX poisons topo II, increasing the levels of complexes, but that at higher concentrations it suppresses the formation of these complexes [3].

We should also note epirubicin, which is a semisynthetic derivative of DOX and was developed to limit its side effects. A positional change of the hydroxyl group at C4 of DOX conferred to epirubicin some pharmacokinetic and metabolic characteristics such as increased volume of distribution, enhanced total body clearance and a shorter terminal half-life, without changing the mode of action and spectrum of activity when compared to DOX

[1,13]. There is also idarubicin, an analog obtained from daunorubicin, which is active against acute myelogenous leukemia, multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma and breast cancer. When compared to daunorubicin, idarubicin presents a broader spectrum of activity, which may be attributed to the increased lipophilicity and cellular uptake and to the improved stabilization of the ternary complex of drug-topo II-DNA [13,14].

In addition to their anti-topo II activity, anthracyclines can also undergo reduction reactions in the presence of metals and oxygen, forming reactive oxygen species (ROS) [13,14]. Moreover, the toxicity of anthracyclines is enhanced by their ability to form adducts in the DNA, which is favored by the presence of formaldehyde [15], and also by the formation of DNA interstrand crosslinks (ICLs) [16]. Despite their effectiveness, the use of anthracyclines is limited by their cardiotoxicity, which is due in part to the high levels of ROS that can be formed, damaging cellular structures [17]. In addition, the imbalance in the intracellular calcium levels by the reticulum sarcoplasmic [18] as well as the specific poisoning of the  $\beta$  isoform, can also contribute to the cardiac toxicity of DOX [19].

The anthracenedione mitoxantrone (MXT) is a synthetic analog of anthracyclines originally developed to reduce the cardiotoxicity of these drugs, and whose original structure maintained the planar polycyclic aromatic ring [20,21]. It was approved by the FDA in 1996 for the treatment of prostate cancer, and it is used in first line therapy for pediatric and adult acute leukemia and second line therapy for breast and prostate cancer and hematological malignancies. In addition, MXT has also been approved for the treatment of multiple sclerosis since 2000 [1]. Besides acting as a topo II poison, due to its structure MXT is still able to intercalate between DNA bases, forming adducts, ICLs and ROS, like

anthracyclines [13,14,21,22]. It has the same cytotoxicity as DOX, but less cardiotoxicity, which can be explained by its lower potential to undergo redox reactions, and the imbalance in the intracellular calcium levels not changing as much as after DOX treatment [14,18].

Etoposide is derived from a podophyllotoxin, a natural product isolated from the plant *Podophyllum peltatum* [12,23]. It is one of the most widely used anticancer drugs, active against many solid tumors, like small cell lung cancers, testicular and germ cell tumors, endocrine tumors, osteosarcomas and Ewing's sarcomas, neuroblastomas and Kaposi sarcomas [1]. Etoposide was among the earliest anticancer agents identified as targeting the type II topoisomerase enzyme and is the most selective drug for targeting the topo II cleavage-complexes currently in clinical use. It does not act as a DNA intercalating agent; its main action mechanism is the DNA-enzyme complex formation [6,24]. The binding of one molecule of etoposide to each monomer of the enzyme allows the formation of single or double strand breaks, depending on the molar ratio between the drug and the enzyme [24]. Fig. 2B shows the structure of anthracyclines and mitoxantrone, showing the presence of a planar polycyclic aromatic ring, and etoposide, a non-intercalator inhibitor.

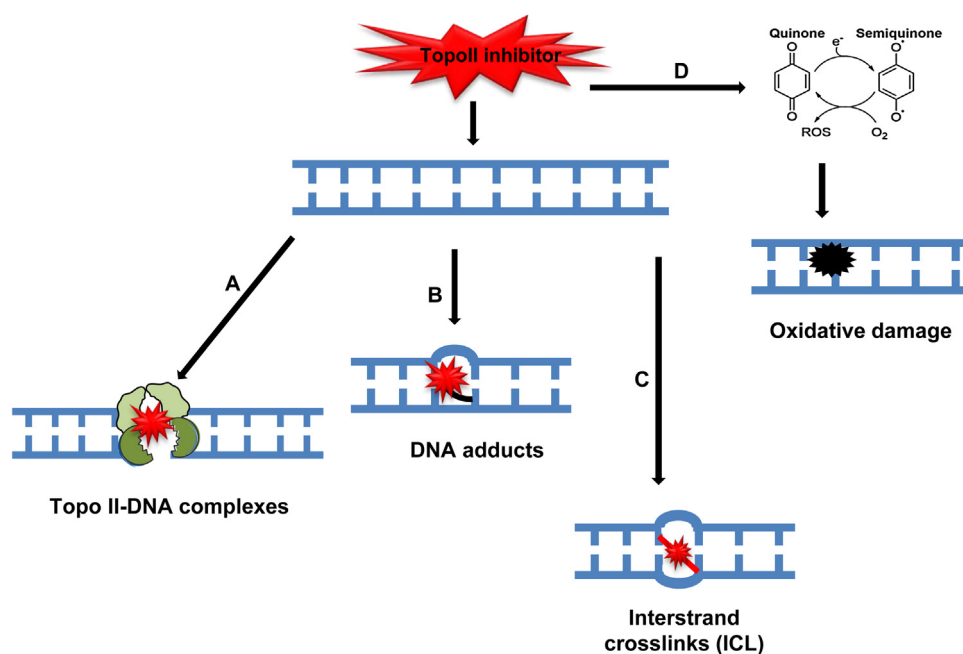
Despite the effectiveness of topo II poisons in cancer treatment, their use has some limitations. First, the use of anthracyclines and MXT may be limited by their cardiotoxicity, even though it is reduced in MXT compared to DOX [14,18,19]. Second, the formation of secondary malignancies that arise from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

The other class, topo II catalytic inhibitors, act by different mechanisms, which include binding to the ATP site, prevention of the ATP hydrolysis step and trapping the enzyme in a closed clamp, blocking the DNA cleavage or preventing the enzyme binding to DNA [26]. The most important class of these compounds is the bisdioxopiperazines (Fig. 2C), such as ICRF-154, ICRF-159, ICRF-193 and ICRF-187 (dexrazoxane), which are not used as antitumor drugs due partly to their reduced antitumor activity, but are used mainly to prevent anthracycline cardiotoxicity [2,17,27]. Bisdioxopiperazines prevent ATP hydrolysis and inhibit the reaction after DNA strand passage by sequestering the protein as a closed clamp in the DNA, and as a result of this action, DNA breaks are induced [28–30,2]. Interestingly, Swift et al. [31] have shown that sobuzaxane (a drug containing the bisdioxopiperazine ICRF-154) enhances the formation of adducts by DOX treatment through formaldehyde generated during its intracellular degradation. In this treatment DOX was shifted from a topo II acting drug to a DNA-adduct forming drug and the combination of the two drugs results in decreased cardiotoxicity and achieves cell kill at lower drug concentrations than required when DOX is used as a single agent [31].

### 3. Topoisomerase II inhibitors versus DNA repair

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

Up to now, the mechanisms involved in the removal of lesions induced by topo II inhibitors are not completely understood. Topo II complexes can be generated in both the replication and transcription process and their removal is fundamental for cellular survival, since their processing leads to the generation of DSBs [1,2,32,33]. This role is accomplished in part by the action of a



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

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

Several studies, from yeast to human cells, have demonstrated the importance of non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) pathways in the repair of DNA damage induced by topo II poisons [39–45]. In one of these studies both HR and NHEJ pathways were important for survival in rodent cells, as expected due to DSBs induced following DOX treatment [41]. In addition, human pancreatic adenocarcinoma BRCA2-defective cells (HR-deficient) are very sensitive to topo II inhibitors (MXT, etoposide and amsacrine) and nude mice harboring tumors defective in this protein are also very sensitive compared to tumors with normal BRCA2 function [44]. Moreover, DNA-PK inhibition improves the sensitivity of cancer cells to MXT, and chronic lymphocytic leukemia patients with higher expression of this protein were more resistant to MXT treatment and have a shorter survival [43]. Interestingly, in most of these works, cells deficient in proteins of NHEJ, like DNA-PKs, Ku70 and Ligase IV, are highly sensitive to topo II poisons, while cells deficient in HR pathway are somewhat less sensitive, indicating the prevalence of NHEJ pathway in the removal of lesions induced by these drugs [39,40,42].

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

Tammaro et al. [33] have shown that low doses of etoposide induce DSBs predominantly during replication while higher doses induce DSBs both during the replication and the transcription process [33]. Interestingly, proteasome inhibition prevents DSB formation only during transcription indicating that proteasome acts in a transcription-dependent mechanism of DSB generation,

and that the replication-dependent mechanism is a parallel way that does not require proteasome-mediated degradation of topo II complexes [33]. TDP2 is required to maintain gene transcription in sites of abortive topo II activity induced by etoposide [48]. As previously mentioned, removal of topo II can be achieved by proteasome [35,36] and enables the processing of complexes by TDP2 [37]. These results lead us to think that proteasome/TDP2 can be the main pathway to the repair of topo II complexes during transcription. However, since TDP2 and NHEJ appear to be predominant in response to these lesions, the exact mechanism of repair during replication still needs to be determined.

Likewise, studies have shown that DNA-strand breaks are the main lesions resulting from the activity of catalytic inhibitors [29,30,49,50]. A study of single-gene deletion mutants in *S. cerevisiae* indicates that HR plays a predominant role in the repair of lesions induced by ICRF-187, while in mammalian cells, both HR and NHEJ seem to be important [30]. Interestingly, in response to ICRF-193, HR mutant cells were not sensitive while elevated sensitivity was observed in both NHEJ and in TDP2 mutant cells, revealing that this drug can act as a topo II poison, like etoposide, or that TDP2 could participate in the removal of this different type of lesion together with NHEJ pathways [42].

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

#### 4. Nucleotide excision repair

Nucleotide excision repair (NER) is the most versatile amongst the DNA repair pathways, and is involved in the removal of lesions that lead to significant structural distortions in the DNA double helix. These lesions include pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts, adducts generated from photoactivated psoralens, cyclopurines, alkylating agents and polycyclic carcinogens [51,52]. Deficiencies in human NER can give rise to hereditary diseases such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD). Patients suffering from these diseases are extremely sensitive to sunlight, and those with XP, complementation group XPA to XPG, are deficient in the excision step of damage induced by ultraviolet (UV) rays and other genotoxic agents, showing a high sensitivity to these agents and a strong predisposition to skin cancer [52–54].

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

Unlike TCR, where the RNA polymerase blockage is sufficient to initiate the process, in GGR other specific proteins are necessary for the recognition of the lesions. Therefore, this step may be limiting in the repair rate, considering that the tightness of protein ligation

in damage recognition depends on the chemical structure of the lesion as well as the way it interferes in the double helix structure. The main damage sensor in GGR is XPC, which is stabilized and assisted by its association with the UV excision repair protein RAD23B and centrin 2 (CETN2). XPC is a DNA ligand protein that detects the damage in an indirect manner, by binding to the undamaged strand opposite to the lesion, and is polyubiquitinated in a reversible manner, which does not result in the protein's degradation but increases its affinity to the DNA. This mode of DNA binding also explains the remarkably broad range of lesions repaired by GGR, as all lesions that induce NER are helix-destabilizing and create short unpaired regions. For some UV-induced lesions, mainly CPDs, the participation of UV-DDB proteins is still necessary [54,55,57,58].

After lesion recognition, the recruitment of other proteins occurs and the sub-pathways converge to a common pathway for the removal of the lesion. The TFIIH complex consists of ten protein subunits and is recruited together with the protein XPG that is responsible for its stabilization. TFIIH was originally identified as an essential transcription initiation factor, but it can switch between functions in transcription and in NER. Between the components of the complex are the helicases XPB and XPD that act in opposite directions; while XPB unwinds the DNA in 3'–5' direction, XPD acts from 5' to 3', resulting in the opening of the region adjacent to the lesion. After DNA unwinding, XPA and RPA proteins (which in some cases may be already recruited before TFIIH), protect the single strand region of the DNA and act as regulators for the recruitment of the next proteins that are necessary for the incision and excision of the lesion [51,55,56,59,60].

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

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

### 5. Topoisomerase II inhibitors versus nucleotide excision repair

The early studies linking the NER proteins to topo II inhibitors indicate that the XPG endonuclease is important for survival in response to TOP-53, an epipodophyllotoxin similar to etoposide [45]. In this work, *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the excision repair protein Rad13 (human homologous XPG) have approximately a ten-fold lower survival rate than wild-type cells

[45]. In addition, yeast cells lacking the endonucleases Rad2 (homologous with human FEN-1) and Uve1 (involved in an alternative pathway to repair UV-induced damage and other lesions) are also very sensitive to TOP-53 [45]. These results suggest that excision repair proteins could be involved in the removal of proteins covalently bound to DNA or are instead required for the processing of DNA strands, allowing them to be substrates to HR or other break repair pathways [45]. In another study, *Saccharomyces cerevisiae* cells defective in the Ssl2 protein (or Rad25) are highly sensitive to DOX. Overexpression of this protein renders cells resistant to the drug, reinforcing participation of NER proteins in response to topo II inhibitors, since Ssl2 is homologous with human XPB, a DNA helicase involved in the initial steps of transcription and in NER as a subunit of the complex TFIIH [65].

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

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

In response to Cosmomycin D, an anthracycline not yet completely characterized, human fibroblasts deficient in XPA or

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

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

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

In response to etoposide, Despras et al. [40] demonstrated that in HeLa cells, long-term silencing of XPC gene expression (which encodes the NER protein involved in the GGR lesion recognition step) leads to a mild sensitivity [40]. XPC knock down cells used in this study also showed an impaired NHEJ activity, therefore this may contribute to the higher sensitivity, and not necessarily the deficiency in the NER pathway, since XPA silenced cells in turn, showed no sensitivity to etoposide [40]. On the other hand, Maede et al. [42] have shown that chicken XPA and XPG-deficient cells had increased sensitivity to etoposide [42], similar to that observed in XPG-deficient yeast cells [45]. Tsai et al. [75] have demonstrated

that etoposide treatment in human lung cancer cells increases the expression of ERCC1 (a critical protein involved in the cleavage of DNA lesions together with XPF during NER) and knockdown of ERCC1 also sensitizes the cells to treatment [75]. The endonuclease ERCC1-XPF can act on resolution of topo I-DNA complexes induced by CPT in mammalian cells, operating as an alternative repair pathway besides the TDP1, a tyrosyl-DNA phosphodiesterase that hydrolyses phosphotyrosyl bonds at DNA 3'-ends, as induced by topo I inhibitors [76]. Indeed, it has been shown recently that ERCC1-XPF in the presence of RPA can cleave 3'-phosphotyrosyl bonds containing oligonucleotides (similar to topo I-complexes), and other NER factors (Pol $\delta$ , FEN1 and LigI) can fill and seal the gap, similar to the normal NER mechanism [77].

The NER involvement in response to topo II catalytic inhibitors is not clear. In response to F11782, a catalytic inhibitor that acts by preventing the binding of topoisomerase to DNA, cells present XPG inhibition, and resistance to this drug is associated with decreased NER activity [78,79]. Also in response to bisdioxopiperazines, yeast cells lacking RAD1 and RAD14 (homologous with human XPF and XPA, respectively) showed no sensitivity against ICRF-187 [30]. In the same way, XPA or XPG-defective chicken cells have a very slight sensitivity to the same drug [42]. In view of the few works conducted in this field, it is not yet possible to establish a relationship between NER and response to topo II catalytic inhibitors. Therefore, more studies are needed to answer this question.

Another approach has considered NER proteins acting in a non-canonical pathway. The proteins XPC, XPA, XPG and XPF/ERCC1 have been shown to be recruited at the promoter of activated genes and to be necessary to achieve optimal DNA demethylation and histone modifications for efficient RNA synthesis, even in the absence of DNA damage, revealing their role in other functions besides damage repair [64]. NER factors XPG, XPF, XPA, XPD and XPB are necessary to form DSBs during the processing of R-loops (RNA-DNA hybrid) forming by absence of transcription factors or topo I inhibition by CPT [80]. Indeed, CSB but not XPC protein, is still necessary for this processing, indicating that paused transcription complexes may trigger TCR-NER factors [80], in accordance with previously mentioned studies demonstrating participation in response to CPT [73,74]. Considering the results in response to topo I-DNA complexes [73,74,76,77,80] and some of the studies previously cited, which show high sensitivity of NER-deficient cells (XPG, FEN1, XPA, ERCC1) to TOP-53 and etoposide [42,45], we cannot exclude the possibility that these NER factors can act in the removal of topo II-DNA complexes, and not necessarily via canonical repair pathways. In addition, an increase in DOX resistance of XPD cells silenced for topo II [67] and also the role of the CSB protein in the resolution of MXT-induced complexes [72] indicate that these proteins could be involved in the repair of lesions induced by topo II blockage during transcription. Taking into account the sensitivity of endonucleases XPG and ERCC1 to topo II inhibitors [42,75], we can also suggest that these endonucleases may provide an alternative to TDP2/NHEJ pathways. Therefore, we cannot neglect the involvement of NER proteins in the processing of topo II-DNA complexes and more studies should be conducted to better clarify their role either in the canonical or in alternative pathways.

## 6. Conclusions

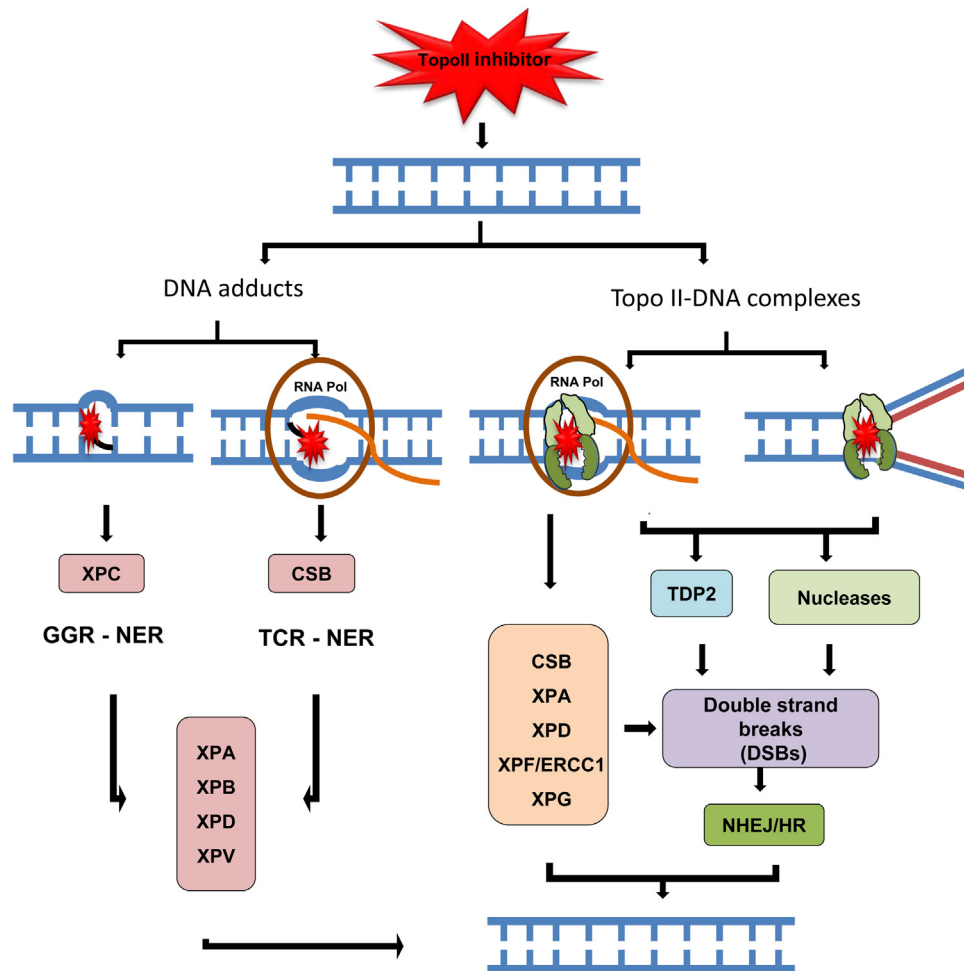
This review highlights the involvement of DNA repair pathways in cellular response to treatment with topo II inhibitors, focusing mainly on topo II poisons (Table 1). The role of DSB repair pathways in the repair of DNA damage induced by these drugs is well established [39–45]. However, their association with other DNA repair pathways involved in this process is still not understood. In

**Table 1**

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

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

HR: homologous recombination, NER: nucleotide excision repair, NHEJ: non homologous end joining, TLS: translesion synthesis.



**Fig. 4.** Proposed mechanism for NER interaction with topo II inhibitors. The induction of lesions like DNA adducts by anthracyclines and mitoxantrone requires a classical NER pathway for their repair, where XPC and CSB proteins are responsible for recognition of lesions in distinct NER sub-pathways and proteins XPD, XPB, XPA and probably XPV are required for further processing of the lesion. On the other hand, in the resolution of topo II-DNA complexes generated by topo II inhibition during transcription, CSB protein could be involved in the initial step to recognize the RNA polymerase blockage. After this, other NER proteins like XPA, XPD, XPG and XPF/ERCC1 could be involved in the processing of DNA damage and the DSBs formed can be repaired by recombinational pathways. Also, the complexes can be removed by TDP2 or nucleases, and the generated DSBs can be repaired by the NHEJ/HR pathways.

an attempt to summarize the possible implications of NER machinery in processing some types of lesions induced by topo II poisons, we represent in Fig. 4 a schematic model for this interaction. We suggest that in response to DNA-adducts formed by anthracyclines and MXT, NER proteins like XPA, XPC, XPB, XPD, CSB and probably XPV can be involved in a classical NER pathway for repair of these lesions [65,67,69,70,72]. On the other hand, topo II-DNA complexes formed during transcription may need the recruitment of the CSB protein to start the processing of lesions, as verified in response to MXT-induced complexes [72]. Other NER proteins like XPD, XPG, XPA, XPG and XPF-ERCC1 could be involved in repair of these complexes [42,45,75], which can also be repaired

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

#### Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

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

## References

- [1] Y. Pommier, Drugging topoisomerases: lessons and challenges, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 82–95.
- [2] J.L. Nitiss, Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 340–352.
- [3] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chem. Biol.* 17 (2010) 421–433.
- [4] J.E. Dewese, N. Osheroff, The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing, *Nucleic Acids Res.* 39 (2009) 740–750.
- [5] J.C. Wang, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 430–440.
- [6] A.K. McClendon, N. Osheroff, DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer, *Mutat. Res.* 623 (2007) 83–97.
- [7] M.O. Christensen, M.K. Larsen, H.U. Barthelmes, R. Hock, C.L. Andersen, E. Kjeldsen, B.R. Knudsen, O. Westergaard, F. Boege, C. Mielke, Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 31–46.
- [8] R.M. Linka, A.C.G. Porter, A. Volkov, C. Mielke, F. Boege, M.O. Christensen, C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo, *Nucleic Acids Res.* 37 (2007) 4010–4022.
- [9] M.L. Rothenberg, Topoisomerase I inhibitors: review and update, *Ann. Oncol.* 8 (1997) 837–855.
- [10] Y. Pommier, M. Cushman, The indenoloquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives, *Mol. Cancer Ther.* 8 (2009) 1008–1014.
- [11] D.B. Khadka, W.J. Cho, 3-Aryloquinolines as novel topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 724–734.
- [12] E. Baldwin, N. Osheroff, Etoposide, topoisomerase II and cancer, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5 (2005) 363–372.
- [13] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229.
- [14] J. Blasiak, E. Gloc, M. Warszawski, A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone, *Acta Biochim. Pol.* 51 (2002) 147–155.
- [15] S.M. Cutts, A. Nudelman, A. Rephaeli, D.R. Phillips, The power and potential of doxorubicin-DNA adducts, *IUBMB* 57 (2005) 73–81.
- [16] A. Skladanovskii, J. Konopa, Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity, *Biochem. Pharmacol.* 49 (1994) 2279–2287.
- [17] E. Martin, A.V. Thougard, M. Grauslund, P.B. Jensen, F. Bjorkling, B.B. Hasinoff, J. Tjornelund, M. Sehested, L.H. Jensen, Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Toxicology* 255 (2009) 72–79.
- [18] A. Chugun, T. Uchida, C. Tsurimaki, H. Nagasawa, T. Sasaki, S. Ueno, K. Takagishi, Y. Hara, K. Temma, Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated Guinea-pig heart preparations, *J. Vet. Med. Sci.* 70 (2008) 255–264.
- [19] S. Zhang, X. Liu, T. Bawa-Khalife, L.S. Lu, Y.L. Lyu, L.F. Liu, E.T.H. Yeh, Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Nat. Med.* 18 (2012) 1641–1644.
- [20] W.W. Au, M.A. Butler, T.S. Matney, T.L. Loo, Comparative structure-genotoxicity of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin, *Cancer Res.* 43 (1981) 396–399.
- [21] B.S. Parker, S.M. Cutts, C. Cullinan, D.R. Phillips, Formaldehyde activation of mitoxantrone yields CpG and CpA specific DNA adducts, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 982–990.
- [22] A. Skladanovskii, J. Konopa, Mitoxantrone and amemantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells, *Br. J. Cancer* 87 (2000) 1300–1304.
- [23] A. Montecucco, G. Biamonti, Cellular response to etoposide treatment, *Cancer Lett.* 252 (2007) 9–18.
- [24] K.D. Bromberg, A.B. Burgin, N. Osheroff, A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II alpha, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7406–7412.
- [25] I.G. Cowell, C.A. Austin, Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to topoisomerase II agents, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9 (2012) 2075–2091.
- [26] B. Pogorelnik, A. Perdih, T. Solmajer, Recent advances in the development of catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase  $\alpha$  as novel anticancer agents, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 694–709.
- [27] S.W. Langer, Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects, *Cancer Manag. Res.* 6 (2014) 357–363.
- [28] J. Roca, R. Ishida, T. Berger, Jm Andoh, J.C. Wang, Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 1781–1785.
- [29] N. Hajji, N. Pastor, S. Mateos, I. Domínguez, F. Cortés, DNA strand breaks induced by the anti-topoisomerase II bis-dioxopiperazine ICRF-193, *Mutat. Res.* 530 (2003) 35–46.
- [30] L.H. Jensen, M. Dejligbjerg, L.T. Hansen, M. Grauslund, P.B. Jensen, M. Sehested, Characterization of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells, *BMC Pharmacol.* 4 (2004) 31.
- [31] L.P. Swift, S.M. Cutts, A. Nudelman, I. Levovich, A. Rephaeli, D.R. Phillips, The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor dexrazoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61 (2008) 739–749.
- [32] S. Soubeyrand, L. pope, R.J. Haché, Topoisomerase II alpha-dependent induction of a persistent DNA damage response in response to transient etoposide exposure, *Mol. Oncol.* 4 (2010) 38–51.
- [33] M. Tamaro, P. Barr, B. Ricci, H. Yan, Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide, *PLoS One* 8 (2013) e79202.
- [34] F. Cortes Ledesma, S.F. El Khamisy, M.C. Zuma, K. Osborn, K.W. Caldecott, A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage, *Nature* 481 (2009) 674–678.
- [35] Y. Mao, S.D. Desai, C.Y. Ting, J. Hwang, L.F. Liu, 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42652–42658.
- [36] Y. Ban, C.W. Ho, R.K. Lin, Y.L. Lyu, L.F. Liu, Activation of a novel ubiquitin-independent proteasome pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock, *Mol. Cell Biol.* 33 (2013) 4208–4216.
- [37] R. Gao, M.J. Schellenberg, S.Y. Huang, M. Abdelmalak, C. Marchand, K.C. Nitiss, J. L. Nitiss, R.S. Williams, Y. Pommier, Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2-DNA and Top2-RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2), *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 17960–17969.
- [38] J. Nitiss, E. Soans, J. Berk, A. Seth, M. Mishina, K.C. Nitiss, Repair of topoisomerase II-mediated DNA damage: fixing DNA damage arising from a protein covalently trapped on DNA, in: Y. Pommier (Ed.), *DNA Topoisomerases and Cancer*, Springer Human Press, New York, 2012, pp. 401–427.
- [39] N. Adachi, H. Suzuki, S. Iizumi, H. Koyama, Hypersensitivity of nonhomologous end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated damage, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 37897–37902.
- [40] E. Despras, P. Pfeiffer, B. Salles, P. Calsou, S. Kuhfittig-Kulle, J.F. Angulo, D.S.F. Biard, Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair, *Cancer Res.* 67 (2007) 2526–2534.
- [41] D.M.S. Spencer, R.A. Bilardi, T.H. Koch, G.C. Post, J.W. Nafie, K.-I. Kimura, S.M. Cutts, D.R. Phillips, DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair, *Mutat. Res.* 640 (2008) 110–121.
- [42] Y. Maede, H. Shimizu, T. Fukushima, T. Kogame, T. Nakamura, T. Miki, S. Takeda, Y. Pommier, J. Murai, Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 214–220.
- [43] S.L. Elliot, C. Crawford, E. Mulligan, G. Summerfield, P. Newton, J. Wallis, T. Mainou-Fowler, P. Evans, C. Bedwell, B.W. Durkaczi, E. Willmore, Mitoxantrone in combination with an inhibitor of a DNA-dependent kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 152 (2011) 61–71.
- [44] D.W. Abbot, M.L. Freeman, J.T. Holt, Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 978–985.
- [45] M. Malik, J.L. Nitiss, DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs, *Eukaryot. Cell* 3 (2004) 82–90.
- [46] J.M. Buerstedde, S. Takeda, Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines, *Cell* 67 (1991) 179–188.
- [47] F. Gómez-Herreros, R. Romero-Granados, Z. Zeng, A. Alvarez-Quilón, C. Quintero, L. Ju, L. Umans, L. Vermeire, D. Huvlebroeck, K.W. Caldecott, F. Cortés-Ledesma, TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo, *PLoS Genet.* 9 (3) (2013) e1003226.
- [48] F. Gómez-Herreros, J.H. Schuuris-Hoejmakers, M. McCormack, M.T. Grealley, S. Rulten, R. Romero-Granados, T.J. Counihan, E. Chaila, J. Conroy, S. Ennis, F. Cortés-Ledesma, A.P. de Brower, G.L. Cavalleri, S.F. El-Khamisy, B.B. de Vries, K. W. Caldecott, TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function, *Nat. Genet.* 46 (2014) 516–521.
- [49] J.M. Barret, M. Cadou, B.T. Hill, Inhibition of nucleotide excision repair and sensitization of cells to DNA cross-linking anticancer drugs by F11782, a novel fluorinated epipodophylloid, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 251–258.
- [50] S. Deng, T. Yan, T. Nikolova, D. Fuhrmann, A. Nemecek, U. Gödtel-Armbrust, B. Kaina, L. Wojnowski, The catalytic topoisomerase II inhibitor dexrazoxane induces DNA breaks, ATF3 and the DNA damage response in cancer cells, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2246–2257.



- [51] R.M. Costa, V. Chiganças, R. da Silva Galhardo, H. Carvalho, C.F. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie* 85 (2003) 1083–1099.
- [52] A. Sarasin, A. Sary, New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway, *DNA Repair (Amst.)* 6 (2007) 265–269.
- [53] R.D. Wood, Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair, *Environ. Mol. Mutagen.* 526 (2010) 520–526.
- [54] S.C. Shuck, E. Short, J.J. Turchi, Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology, *Cell Res.* 18 (2008) 64–72.
- [55] P.C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription-coupled repair: two decades of progress and surprises, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 958–970.
- [56] O.D. Scharer, Nucleotide excision repair in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012609.
- [57] I. Kamilleri, I. Karakaslioti, G.A. Garinis, Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks, *Trends Genet.* 28 (2012) 566–573.
- [58] G. Spivak, A.K. Ganesan, The complex choreography of transcription-coupled repair, *DNA Repair (Amst.)* 19 (2014) 64–70.
- [59] F. Altieri, C. Grillo, M. Maceroni, S. Chichiarelli, DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 891–937.
- [60] J.A. Martelijn, H. Lans, W. Vermeulen, J.H. Hoejmakers, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 465–481.
- [61] J. Zhang, J.C. Walter, Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair, *DNA Repair (Amst.)* 19 (2014) 137–144.
- [62] T. Iyama, S.Y. Lee, B.R. Berquist, O. Gileadi, V.A. Bohr, M.M. Seidman, P.J. McHugh, D.M. Wilson 3rd, CSB interacts with SNM1 and promotes DNA interstrand crosslink processing, *Nucleic Acids Res.* 45 (2015) 249–258.
- [63] J.P. Melis, H. van Steeg, M. Luijten, Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2409–2419.
- [64] N. Le May, D. Mota-Fernandes, R. Vélez-Cruz, I. Iltis, D. Biard, J.M. Egly, NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack, *Mol. Cell* 40 (2010) 54–66.
- [65] T. Furuchi, T. Takahashi, S. Tanaka, K. Nitta, A. Naganuma, Functions of yeast Ssl2p that are essential for viability are also involved in protection from the toxicity of adriamycin, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 2578–2585.
- [66] Y. Takebayashi, P. Pourquier, D.B. Zimonjic, K. Nakayama, S. Emmert, T. Ueda, Y. Urasaki, A. Kanzaki, S.-I. Akiyama, N. Popescu, K.H. Kraemer, Y. Pommier, Antiproliferative activity of ecteinascidin 745 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair, *Nat. Med.* 7 (2001) 961–969.
- [67] J. Saffi, M.H. Agnoletto, T.N. Guecheva, L.F.Z. Batista, H. Carvalho, J.A.P. Henriques, A. Sary, C.F.M. Menck, A. Sarasin, Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells, *DNA Repair (Amst.)* 9 (2010) 42–47.
- [68] N. Kuptsova-Clarkson, C.B. Ambrosone, J. Weiss, M.R. Baer, L.E. Sucheston, G. Zirpoli, K.J. Kopecky, L. Ford, J. Blanco, M. Wetzler, K.B. Moysich, XPD DNA nucleotide excision repair gene polymorphisms associated with DNA repair deficiency predict better treatment outcomes in secondary acute myeloid leukemia, *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 1 (2010) 278–294.
- [69] H. Carvalho, L.M. Garrido, R.L. Furlan, G. Padilla, M. Agnoletto, T. Guecheva, et al., DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65 (2010) 989–994.
- [70] M.C.S. Moraes, A.Q. de Andrade, H. Carvalho, T. Guecheva, M.H. Agnoletto, J.A.P. Henriques, J. Saffi, C.F.M. Menck, Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions, *Cancer Lett.* 314 (2012) 108–118.
- [71] Y. Auclair, R. Rouget, J.M. Belisle, S. Costantin, E.A. Drobetsky, Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase, *DNA Repair (Amst.)* 9 (2010) 754–764.
- [72] J.C. Rocha, F.F. Busatto, L.K. Souza, J. Saffi, Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity, *DNA Repair* (2016) (in press).
- [73] K. Horibata, M. Saijo, M.N. Bay, L. Lan, I. Kuraoka, P.J. Brooks, M. Honma, T. Nohmi, A. Yasui, K. Tanaka, Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex, *Genes Cells Dev.* 101 (2011) 101–114.
- [74] A. Sakai, R. Sakasai, Y. Kakeji, H. Kitao, Y. Maehara, PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks, *Genes Genet. Syst.* 87 (2012) 265–272.
- [75] M.S. Tsai, S.H. Weng, H.J. Chen, Y.F. Chiu, Y.C. Huang, S.C. Tseng, Y.H. Kuo, Y.W. Lin, Inhibition of p38 MAPK-dependent excision repair cross-complementing 1 expression decreases the DNA repair capacity to sensitize lung cancer cells to etoposide, *Mol. Cancer Ther.* 11 (2012) 561–571.
- [76] Y.W. Zhang, M. regairaz, J.A. Seiler, K.K. Agama, J.H. Doroshow, Y. Pommier, Poly (ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 29 (2011) 3607–3620.
- [77] C. Takahata, Y. Masuda, A. Takedachi, K. Tanaka, S. Iwai, I. Kuraoka, Repair synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex, *Carcinogenesis* 36 (2015) 841–851.
- [78] J. Barret, B.T. Hill, P.L. Olive, Characterization of DNA-strand breakage induced in V79 cells by F 11782, a catalytic inhibitor of topoisomerases, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 1740–1746.
- [79] A. Kruczynski, J.M. Barret, B. Van Hille, N. Chansard, J. Astruc, Y. Menon, C. Duchier, L. Créancier, B.T. Hill, Decreased nucleotide excision repair activity and alteration of topoisomerase II alpha are associated with the in vivo resistance of a P388 leukemia subline to F11782, a novel catalytic inhibitor of topoisomerase I and II, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3156–3168.
- [80] J. Sollier, C.T. Stork, M.L. García-Rubio, R.D. Paulsen, A. Aquilera, K.A. Cimprich, Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability, *Mol. Cell* 56 (2014) 777–785.

**4. Capítulo II: “Topoisomerase II inhibitors-induced lesions – at the crossroads between NER and DSBs pathway”**

Manuscrito de dados escrito nas normas  
da revista *DNA Repair*

## APRESENTAÇÃO

Neste capítulo é apresentado um manuscrito contendo dados referentes a uma parte dos objetivos desta tese. Os dados demonstrados a seguir são resultados de experimentos e pesquisa desenvolvidos, na sua maior parte, no laboratório de Instabilidade Genômica coordenado pelo professor Jean-Yves Masson, na Université Laval, Quebec city, Canadá, durante o período de doutorado sanduíche da autora da tese.

Nesta parte da tese buscou-se explorar uma abordagem de estudo com foco no mecanismo de ação dos inibidores de TOP2, a fim de compreender melhor as lesões geradas por estas drogas e qual o papel de proteínas da via NER, mais especificamente CSB, nesta resposta. Buscando compreender a ligação entre as vias NER e de reparo de quebras duplas em resposta às lesões induzidas por quimioterápicos inibidores de TOP2.

**5. Capítulo III: “Analysis of Cell Growth and Nucleotide Excision Repair Pathway Modulation in Breast Cancer Cells Submitted to a Chemotherapeutic Protocol Using Doxorubicin and Paclitaxel”**

Manuscrito de dados escrito nas normas  
da revista *Molecular Cancer Research*

## APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentados no capítulo a seguir foram compilados em um manuscrito de dados a ser submetido à revista *Molecular Cancer Research*. Esta parte do trabalho foi realizada inteiramente nas dependências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos laboratórios de Genética Toxicológica e Biologia Molecular. O trabalho foi pensado e planejado por mim, mas contei com grande ajuda experimental e de análise de dados da Victória Pereira Viero, a qual divide autoria comigo neste manuscrito. Parte destes dados também fizeram parte do trabalho de conclusão de curso em Biomedicina da UFCSPA apresentado pela Victória em junho de 2018.

Neste manuscrito são apresentados os ensaios realizados com o objetivo de acompanhar células em tratamento quimioterápico a longo prazo, tentando aproximar o tratamento *in vitro* da prática clínica. O protocolo escolhido também contava com uma droga inibidora de TOP2, e ao longo do protocolo realizou-se a análise de diferentes parâmetros, matemáticos, celulares e moleculares, para uma melhor compreensão dos eventos desencadeados ao longo das diferentes etapas do protocolo aplicado.

## 6. DISCUSSÃO INTEGRADA

Atualmente, um dos maiores desafios na oncologia clínica não é o tratamento do câncer primário em si, uma vez que existe uma ampla variedade de estratégias, sejam elas com o uso ou não de drogas quimioterápicas, que atuam reduzindo eficientemente a massa tumoral; mas sim o fenômeno de recorrência. Apesar da grande eficácia inicial da maior parte dos tratamentos contra o câncer, ainda são muito frequentes os casos de pacientes que apresentam uma boa resposta ao tratamento por um determinado período e, após um tempo, manifestam novamente sinais da doença, estando normalmente em estágio considerado mais avançado. A grande pergunta que fica nestes casos é se as células tumorais que resistiram ao primeiro tratamento já apresentavam esse perfil de resposta desde o início, caracterizando uma resistência intrínseca, e, neste caso, por serem minoria não foram capazes de alterar o percurso geral do tratamento; ou se estas células adquiriram esse perfil resistente ao longo deste tratamento, acumulando uma série de mutações que podem ter modificado diferentes características responsáveis pela alteração de resposta das células às drogas quimioterápicas. Ainda assim, pode-se imaginar também que seria possível que ambos os fenômenos poderiam acontecer dentro de um mesmo tumor, uma vez que se sabe que cada célula é única e, portanto, pode responder de maneira diferente.

Esta heterogeneidade dentro de um mesmo tumor, bem como entre tumores, é o maior desafio para o tratamento, uma vez que drogas com mecanismo de ação já bem definidos na literatura podem funcionar muito bem para eliminar alguns tumores ou células dentro do mesmo tumor, e nem tão bem

para outros. Sendo assim, é de extrema importância o melhor entendimento da biologia celular e molecular do câncer, bem como do mecanismo de ação de drogas já utilizadas, a fim de identificar bem os alvos e comportamentos celulares em resposta às mesmas.

Apesar do reparo de danos ao DNA ser um mecanismo protetor para as células normais, impedindo a permanência de lesões que poderiam levar a morte celular ou indução de mutações, em células tumorais este mecanismo geralmente apresenta efeitos contrários, removendo as lesões que seriam responsáveis pela morte celular, diminuindo a eficácia dos tratamentos (GAVANDE et al., 2016; HELLEDAY et al., 2008). Com os trabalhos desenvolvidos ao longo desta tese, buscou-se explorar melhor os mecanismos de ação de diferentes drogas inibidoras de TOP2 que já são classicamente usadas na prática clínica, de forma a entender o papel do reparo pela via NER na resposta aos tratamentos com estas drogas, a qual poderia estar mediando ou não a geração das quebras duplas no DNA geradas pelos inibidores de TOP2; além de modulando um perfil de crescimento de células tumorais tratadas a longo prazo. Estas investigações surgiram em decorrência de perguntas que ficaram de trabalhos anteriores do grupo, em que já vimos uma influência de NER na resposta à diferentes drogas inibidoras de TOP2 (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; ROCHA et al., 2016b; SAFFI et al., 2010), bem como um maior acúmulo das principais lesões induzidas por estas drogas (os Top2ccs) em células deficientes em CSB, uma importante proteína da via NER, quando tratadas com a droga MXT (ROCHA et al., 2016b).

O trabalho apresentado no capítulo I é um artigo de revisão que explora os diferentes quimioterápicos mais conhecidos inibidores de TOP2 bem como os

mecanismos pelos quais as diferentes lesões induzidas por estas drogas são reparadas. Apesar de discutir sobre o papel das vias nucleolíticas e da proteína TDP2, bem como das vias de reparo de DSBs (HR e NHEJ) no reparo dos complexos Top2ccs, o enfoque principal do artigo foi a participação da via NER neste processo. Ao final do artigo apresentamos um modelo propondo que além das proteínas da via NER atuarem na remoção de adutos induzidos pelos inibidores de TOP2 do tipo antraciclinas e análogos (como a MXT), estas mesmas proteínas também poderiam estar envolvidas na remoção dos Top2ccs. No primeiro caso seria uma situação de via NER canônica, enquanto que o envolvimento na resposta aos complexos poderia ser relacionado à parada da RNA polimerase quando os mesmos fossem formados durante a transcrição. Esta parada é um gatilho inicial para o recrutamento de CSB, que parece ser importante para a resolução dos complexos, e pode ainda recrutar outros fatores da via NER, como as endonucleases XPF-ERCC1 e XPG, que poderiam ser fundamentais para mediar a geração de DSBs no processamento dos Top2ccs, as quais seriam reparadas pelas vias HR ou NHEJ. Já quando os complexos fossem gerados em regiões que não estão sendo transcritas, os principais mecanismos para o seu processamento seriam os já bem estabelecidos, através da atuação de TDP2/NHEJ e nucleases/HR (GAO et al., 2014; NITISS; NITISS, 2013; POMMIER et al., 2014).

No capítulo II da tese foi apresentado um manuscrito com um conjunto de dados experimentais realizados com o objetivo de compreender melhor o mecanismo desta possível interação de NER, ou mais especificamente de CSB, na resposta aos inibidores de TOP2. Diferentemente dos trabalhos anteriores do grupo em que foram utilizados fibroblastos imortalizados originados de pacientes



portadores de mutações em genes da via NER, neste avaliamos a ausência deste sistema de reparo na resposta aos inibidores de TOP2 em células tumorais U2OS, através do silenciamento de genes da via NER como ERCC6 (codificante para CSB), XPC e XPA. Mesmo com o modelo celular diferente, a alta toxicidade de DOX e MXT foi reproduzida nas células U2OS, sendo por isso a escolha de baixas doses de quimioterápicos aplicados aos tratamentos a fim de manter as células viáveis e ainda assim explorar as alterações moleculares que estavam sendo geradas com a exposição aos tratamentos.

Na análise de marcadores de DSBs  $\gamma$ H2AX e 53BP1 por imunofluorescência conseguimos identificar algumas sutis diferenças entre as condições de *knockdown* testadas. De maneira geral, o *knockdown* de XPC parece diminuir a formação de foci de  $\gamma$ H2AX após os tratamentos com DOX e MXT, e de 53BP1 apenas após DOX, em relação as células controle ou células com *knockdown* para ERCC6. Já as células com ausência do gene codificante para CSB (ERCC6) apresentaram uma maior indução de foci de  $\gamma$ H2AX em relação ao controle em ambos os tratamentos, no entanto o mesmo não foi observado para a marcação de foci de 53BP1. Isto vai de encontro aos achados por Batenburg et al, onde o *knockout* de CSB foi capaz de formar, bem como acumular por mais tempo, foci de 53BP1 e RIF1, um outro importante fator de estimulação à via NHEJ (BATENBURG et al., 2015). No entanto, neste trabalho a indução de quebras foi através de radiação ionizante (*ionizing radiation* - IR), a qual é uma fonte de geração direta de DSBs no DNA, enquanto que no caso dos inibidores de TOP2, as quebras são uma consequência dos complexos Top2ccs bem como do seu processamento. Sakai et al, mostraram que em células com *knockdown* de CSB a formação de foci de 53BP1 induzidos pelo

inibidor de TOP1 Camptotecina era significativamente reduzida em relação às células controle (SAKAI et al., 2012). Além disso, este mesmo trabalho mostra que esta redução não é devido a uma menor taxa de transcrição nas células CSB KO. Sendo assim, sugerem que CSB estaria envolvida na formação de foci de 53BP1 durante a transcrição. No nosso caso, não foi avaliada a inibição ou ativação de transcrição no processo, no entanto esta análise agregaria bastante ao trabalho.

Além disso, encontramos através de co-imunoprecipitação uma interação de CSB com ambas as isoformas de TOP2 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que poderia ser um importante indicativo do papel de CSB em resposta aos Top2ccs gerados pelos inibidores. Com a isoforma  $\beta$  esta interação parece ocorrer apenas após a indução de dano por MXT, enquanto que para a  $\alpha$  observamos uma leve interação mesmo em condições sem tratamento, mas mais pronunciada em resposta à DOX e MXT. Nesta análise foi adicionada a droga ETO, que é conhecida por formar especificamente apenas os complexos Top2ccs como lesão, enquanto as antraciclinas e análogos, conforme mencionado na introdução desta tese, são capazes de gerar outros tipos de lesões no DNA. Surpreendentemente, a interação entre CSB e TOP2 encontrada não foi mais relevante nos tratamentos com ETO. Apesar desta análise ter sido conduzida em um tempo mais curto de tratamento (2 h), as doses utilizadas tanto para DOX e MXT quanto para ETO já eram capazes de induzir danos nas células.

Esta interação foi um importante achado, pois pode indicar a importância de CSB em ser recrutada em regiões de transcrição ativas em que ocorreriam colisões entre os complexos Top2ccs e a RNA Pol. Neste caso, CSB poderia ser fundamental para auxiliar no processamento destes complexos e ainda,

possivelmente, recrutar outros fatores de reparo (seja via NER ou não) para a continuidade do processo.

Diferentes trabalhos já demonstraram um envolvimento de CSB no processamento de híbridos de DNA:RNA conhecidos como R-loops (SOLLIER et al., 2014; TENG et al., 2018). Estas estruturas acontecem de maneira espontânea durante a transcrição, através da hibridização do mRNA com uma das fitas de DNA, mantendo a outra deslocada na bolha de transcrição (BHATIA et al., 2017; CHÉDIN, 2016; SANTOS-PEREIRA; AGUILERA, 2015). A formação de R-loops já foi relatada ser maior em tratamentos com inibidores de TOP1 (MANZO et al., 2018; MARINELLO et al., 2016), e isto se deve muito provavelmente à importância desta enzima na manutenção da topologia de DNA, uma vez que ela evita a formação de *supercoiling* negativo. Levando isso em consideração, decidimos investigar a formação de R-loops em resposta à inibição de TOP2.

A detecção experimental de R-loops é bastante questionada na literatura, uma vez que o anticorpo amplamente utilizado para isto (anti-S9.6) parece ser muito inespecífico em algumas metodologias como imunofluorescência, mas bem aceito em outras como imunoprecipitação seguida de análise por qPCR ou sequenciamento (DRIP-qPCR/seq) (VANOOSTHUYSE, 2018). Sendo assim, escolhemos a abordagem de DRIP-qPCR para fazer esta análise e também optamos por utilizar apenas o ETO como tratamento, com o objetivo de verificar o efeito apenas da formação de Top2ccs na geração e acúmulo de R-loops. A nossa hipótese é de que ocorreria uma parada da RNA Pol ao encontrar os complexos, e esta parada poderia favorecer a hibridização do novo mRNA com o DNA, bem como recrutaria CSB. Sendo assim, na ausência de CSB esta

sinalização seria atrasada e poderíamos encontrar mais R-loops acumulados. Os resultados encontrados, no entanto, não foram capazes de confirmar exatamente esta hipótese. O que parece acontecer é que a inibição de TOP2 pelo ETO, nos dois tempos e doses avaliados, não gerou níveis maiores de R-loops em 4 dos 5 loci analisados, tanto nas células CSB KD quanto nas células controle. No entanto o silenciamento de TOP2, independente do tratamento com inibidores farmacológicos, demonstrou um aumento nos níveis de R-loops, principalmente no caso de siTOP2A.

Apesar de, no presente momento, os resultados expostos do ensaio DART representarem a quantificação de somente um experimento, a análise vai ao encontro do que encontramos na DRIP-qPCR, uma vez que os *knockdowns* de TOP2 apresentaram maior acúmulo de R-loops no locus específico que teve indução de dano do tipo ERO e com transcrição ativa. Quando a mesma análise foi realizada em uma região com transcrição inativa esta diferença não foi tão marcante, no entanto ainda assim as células siTOP2A apresentaram um leve aumento do acúmulo de R-loops. Isto indica que a presença de TOP2 pode ser importante para a melhor resolução ou não ocorrência destes híbridos. Sabe-se que TOP2 $\alpha$  está mais relacionada com processos de replicação enquanto a isoforma  $\beta$  com transcrição (AUSTIN et al., 2018; YAN; TAMMARO; LIAO, 2016), o que pode explicar a sutil diferença observada entre as duas no ensaio DART. Conforme já mencionado, nós não avaliamos uma condição com inibição de transcrição, no entanto seria uma abordagem bastante interessante que poderia nos fornecer mais informações sobre o mecanismo e a especificidade da geração e processamento dos Top2ccs neste contexto.

O *supercoiling* negativo no DNA acontece atrás da abertura da dupla fita

nos processos de replicação e transcrição e é resolvido pela ação da TOP1, já o *supercoiling* positivo acontece à frente das bolhas de replicação e transcrição e precisa da TOP2 para a sua resolução. Existem relatos de que a presença de *supercoiling* negativo tem a tendência a estabilizar R-loops formados, enquanto que o positivo os resolveria (BELOTSEKOVSKII et al., 2018). Isto pode explicar o porquê de diferentes estudos já terem encontrado indução de R-loops após inibição de TOP1 e nós não achamos o mesmo com a inibição de TOP2. No entanto, não explica os nossos achados com os silenciamentos de TOP2, onde independente de inibição farmacológica, a ausência de TOP2 parece sim ser importante para a formação ou acúmulo de R-loops.

Embora não tenhamos avaliado, deve-se lembrar que neste contexto também pode haver um importante papel da proteína TDP2, a qual é uma endonuclease fundamental na remoção da TOP2 ligada covalentemente ao DNA, auxiliando a remoção dos complexos Top2ccs para a geração de DSBs (NITISS; NITISS, 2013; POMMIER et al., 2014). Com certeza seria bastante interessante uma análise da formação de R-loops em resposta aos inibidores de TOP2 em células sem a presença funcional de TDP2, pois assim poderíamos nos certificar de que os complexos não estariam sendo removidos por este meio e então verificar o quanto a sua presença pode influenciar na geração de R-loops na presença ou não de CSB, combinando ainda com uma inibição de transcrição.

Enquanto o estudo apresentado no capítulo II foi uma abordagem bastante mecanística a nível de biologia molecular, no trabalho que constitui o capítulo III da tese tivemos um olhar um pouco diferente, focando no comportamento celular em resposta a um tratamento com uma droga inibidora de TOP2 através de uma abordagem mais próxima da prática clínica, mesmo

estando ainda no modelo *in vitro*. Neste trabalho o objetivo foi aplicar um protocolo de tratamento quimioterápico que utilizasse um inibidor de TOP2 em células tumorais e que se aproximasse do que é feito na clínica em pacientes, com um acompanhamento destas células a longo-prazo. Além disso, analisar se frente a estes tratamentos ocorreu alguma modulação da via NER que poderia ser importante para a resposta encontrada. Este modelo de análise foi baseado no guia proposto por Silva e colaboradores e adaptado para o interesse do nosso estudo (SILVA et al., 2016).

Foi escolhido aplicar um protocolo que utilizasse uma droga inibidora de TOP2 (a DOX) em combinação com outro quimioterápico (PCTX) em células de câncer de mama, mesmo tumor no qual ambas as drogas são utilizadas no tratamento clínico. A ideia deste trabalho começou com o objetivo de estudar um perfil resistente de células, no entanto desde o início já sabíamos que não queríamos seguir os modelos tradicionais de aplicação constante de doses crescentes de droga a fim de obter uma linhagem resistente. Nosso objetivo era realmente ver ao longo de todos os ciclos de um protocolo quimioterápico como seria a resposta destas células mesmo sendo tratadas com as mesmas concentrações de drogas. Além disso, tentar acompanhar as poucas células remanescentes de cada ciclo e ao final de todos os ciclos, a fim de identificar uma possível população resistente.

O modelo proposto neste trabalho permitiu a avaliação do crescimento das células MCF7 durante e após a aplicação do protocolo quimioterápico, não limitando o estudo a uma avaliação pontual que exclui o percurso das células remanescentes. Ao longo do tratamento, pôde-se perceber que as drogas apresentaram uma boa eficiência uma vez que o CPD das células tratadas foi

bastante reduzido em comparação ao das células controle, em todas as replicatas. Além disso, acompanhou-se também o potencial de crescimento das células tumorais remanescentes após a primeira fase do protocolo (4 ciclos de DOX) ou ao final do protocolo completo (4 ciclos de DOX + 4 ciclos de PCTX). Esta análise foi bastante importante, pois as poucas células viáveis após estes diferentes momentos do tratamento apresentaram potencial para retomar seu perfil de crescimento tal como o controle negativo e continuar se propagando, conforme indicado pelo parâmetro RPR. Esta constatação tem uma grande relevância clínica, visto que mostra o potencial das células tumorais, mesmo em pequena quantidade, de retomarem seu crescimento normal após uma medida terapêutica, situação conhecida na clínica como recidiva.

Apesar de não apresentado aqui, foi tentado mais de uma vez expor as células remanescentes, que ainda estavam vivas após todo o período de recuperação sem tratamentos, a novos ciclos de DOX. Surpreendentemente estas células voltaram a morrer. Este fato nos leva a pensar que pode ocorrer uma pressão seletiva, onde no momento em que estão sendo expostas aos tratamentos as células demonstram uma elevada sensibilidade, a qual é perdida quando não há mais essa exposição. Este conceito já é bastante discutido na literatura, onde acredita-se que o modelo Darwiniano de seleção natural também acontece dentro de um tumor (GATENBY; BROWN, 2018; GERLINGER; SWANTON, 2010). No entanto, devemos pensar também que provavelmente a seleção de subpopulações com maior capacidade de proliferação seja logo reprimida com o reestabelecimento da heterogeneidade tumoral à medida que a pressão seletiva (neste caso o tratamento quimioterápico) é removida do meio, e, neste caso, quando o tratamento fosse adicionado novamente a maioria das

células dentro deste mesmo tumor voltariam a se demonstrar sensíveis (GERLINGER; SWANTON, 2010). Ao encontro disto vão algumas teorias mais recentes, se comparadas à história da quimioterapia, com o conceito de terapia adaptativa, onde a abordagem de tratamento do câncer deveria ter como meta o controle máximo do tumor, incluindo qualidade e longevidade de vida ao paciente (GATENBY et al., 2009). Nessa abordagem o principal objetivo é controlar o crescimento do tumor, mesmo que isto implique em uma ausência da total remissão, mas também uma ausência de progressão da doença. Isto porque, na presença de células sensíveis ao tratamento as células resistentes não demonstram tanta capacidade de proliferar, uma vez que seu *fitness* celular é reduzido em relação às células sensíveis, já que para manter este perfil resistente é preciso alterar uma série de mecanismos intracelulares. Para esta estratégia então, seriam usadas doses extremamente baixas de drogas quimioterápicas, capazes de manter a qualidade de vida do paciente e ainda estabilizar o tumor através da manutenção de células sensíveis ainda viáveis com o objetivo de não aumentar a proliferação das células resistentes; sendo que as doses administradas podem ser constantemente ajustadas conforme a dinâmica de resposta tumoral (GATENBY et al., 2009; GATENBY; BROWN, 2018).

É difícil definir resistência tumoral, principalmente *in vitro*. A grande maioria dos trabalhos consideraria que as células tratadas são resistentes somente quando praticamente não há resposta ou indução alguma de morte. No entanto, nosso trabalho mostra que apesar de maneira geral, o tratamento se demonstrar bastante efetivo, aquela pequena porcentagem de células que ainda sobreviveu nos diferentes momentos, foi resistente pelo menos durante aquele



período. É importante lembrar também que a resistência pode ser transitória, ou seja, seguindo ainda a ideia de pressão seletiva, onde uma mesma célula responde de maneiras diferentes em diferentes momentos. Os cânceres são altamente dinâmicos com uma grande heterogeneidade temporal e espacial que pode ainda ser rapidamente alterada por fatores externos como a própria terapia (GATENBY; BROWN, 2018; GREENE; GEVERTZ; SONTAG, 2019). Um tumor e suas populações de células sobreviventes com certeza apresentam diferenças moleculares em um segundo ciclo de tratamento em comparação ao primeiro; e, com certeza, muito mais diferente ao final de todo o protocolo de tratamento ou em uma situação de recidiva (GATENBY; BROWN, 2018). Isto ressalta mais uma vez a importância de se fazerem mais trabalhos com análises a longo prazo, e não só com avaliações pontuais, a fim de melhor compreender as alterações celulares e moleculares mais comuns que acontecem ao longo de um tratamento quimioterápico.

O estudo dos mecanismos celulares que mantêm as células viáveis durante a aplicação do protocolo, bem como dos que permitem elas seguirem seu crescimento após um período de recuperação, é importante para que sejam traçadas novas abordagens terapêuticas. Neste trabalho, foi verificado o aumento da expressão de 4 genes da via NER (ERCC6, ERCC4, XPA e XPC) e um gene da via HR (MRE11) nas células expostas ao quimioterápico DOX, tanto após o término do primeiro ciclo aplicado, como ao término do quarto ciclo (último de DOX), quando comparadas às células não tratadas. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, pode-se observar que o gene ERCC6, o qual codifica a proteína CSB, foi o único que se apresentou levemente mais expresso após 4 ciclos de DOX em comparação a sua expressão após 1 ciclo.

Com certeza, para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que possam ter sido modulados ao longo de toda a aplicação do protocolo é ideal que se façam análises em outros pontos do protocolo, bem como de mais genes, inclusive envolvidos em outros mecanismos já bem relacionados com a malignidade e ausência de resposta tumoral aos tratamentos. O modelo proposto permite com que estas análises ainda sejam feitas, uma vez que há material (RNA e células crio preservadas) coletado dos pontos finais de cada um dos 8 ciclos quimioterápicos aplicados bem como ao final do período de acompanhamento pós-tratamentos.

## 7. CONCLUSÃO

### 7.1 *Conclusão Geral*

Com esta tese foi possível unir duas abordagens de extrema importância no estudo do câncer: uma análise mais pontual e mecanística, voltada para o entendimento da relação entre o sistema de reparo NER na resposta as lesões induzidas ao DNA por inibidores de TOP2; e uma análise a longo prazo com foco no acompanhamento da resposta de células tumorais à aplicação *in vitro* de um protocolo semelhante à clinica, buscando padronizar as condições ideais para a realização desta metodologia a fim de permitir análises a nível celular e molecular ao longo de diferentes pontos deste protocolo.

### 7.2 *Conclusões Específicas*

- A sinalização de quebras duplas no DNA em resposta a tratamentos com DOX e MXT é diferente em células com *knockdowns* para genes de diferentes etapas da via NER: células tumorais com silenciamento em ERCC6 apresentam maior sinalização de  $\gamma$ H2AX em resposta à DOX e MXT, enquanto que células silenciadas para XPC apresentam menor formação de foci de  $\gamma$ H2AX em resposta à DOX e MXT em relação ao controle e às células siERCC6;
- Existe uma interação de CSB com TOP2 $\alpha$  em resposta à DOX e MXT e com TOP2 $\beta$  em resposta à MXT;
- A inibição farmacológica de TOP2 não gera aumento de R-loops, mas o silenciamento de TOP2 sim;
- A aplicação *in vitro* de um protocolo quimioterápico semelhante às práticas clínicas foi capaz de reduzir a proliferação de células tumorais no

momento em que as mesmas estavam submetidas aos tratamentos;

- As células tumorais remanescentes aos ciclos de tratamentos com DOX ou DOX+PCTX foram capazes de retomar seu crescimento de maneira semelhante ao controle;

- Há uma maior expressão dos genes XPA, XPC, ERCC6, ERCC4 e MRE11 em células submetidas a ciclos de tratamentos com DOX em relação às não tratadas, no entanto não há um padrão na alteração da expressão destes genes após um ou quatro ciclos de tratamentos.

## 8 PERSPECTIVAS

### *Com relação ao capítulo II*

- Concluir as análises das replicatas do ensaio DART;
- Avaliar a influência da inibição da transcrição na indução de R-loops após tratamentos com inibidores de TOP2;
- Investigar a mesma resposta na ausência de TDP2.

### *Com relação ao capítulo III*

- Realizar ciclos de tratamento com PCTX sem tratamento prévio com DOX, a fim de comparar as diferenças de respostas entre as duas drogas;
- Acompanhar as células tratadas somente com PCTX por um período de recuperação pós ciclos de tratamento;
- Avaliar os mesmos, bem como mais genes de reparo de DNA, em diferentes pontos do protocolo aplicado além dos já analisados.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. DNA-RNA hybrids: The risks of DNA breakage during transcription. **Nature Structural and Molecular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 439–443, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2019**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

ANDRÉ CRUZ-GARCÍA, A.; LÓPEZ-SAAVE-DRA, A.; HUERTAS, P. BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection Graphical Abstract Highlights A high-resolution method is used to measure DNA-end resection BRCA1 interaction with CtIP is not essential for resection BRCA1 interaction with CtIP affects resection speed. **CellReports**, [s. l.], v. 9, p. 451–459, 2014.

ARORA, S. et al. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. **DNA Repair**, [s. l.], v. 9, p. 745–753, 2010.

AU, W. W. et al. Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. **Cancer research**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 376–9, 1981.

AUSTIN, C. A. et al. TOP2B: The first thirty years. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 1–21, 2018.

AZIM, H. A. et al. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 22, 2011.

BALDWIN, E.; OSHEROFF, N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 363–372, 2005.

BATENBURG, N. L. et al. Cockayne syndrome group B protein regulates DNA double-strand break repair and checkpoint activation. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 34, p. 1399–1416, 2015.

BATENBURG, N. L. et al. ATM and CDK2 control chromatin remodeler CSB to inhibit RIF1 in DSB repair pathway choice. **Nature Communications**, [s. l.], 2017.

BELOTSERKOVSKII, B. P. et al. R-loop generation during transcription: Formation, processing and cellular outcomes. **DNA Repair**, [s. l.], p. 1–13, 2018.

BHATIA, V. et al. The role of replication-associated repair factors on R-loops. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–12, 2017.

BINASCHI, M. et al. Anthracyclines: selected new developments. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 113–30, 2001.

BLASIAK, J. DNA-Damaging Anticancer Drugs – A Perspective for DNA Repair-Oriented Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 15, p. 1488–1503, 2017.

BLASIAK, J.; GLOC, E.; WARSZAWSKI, M. **A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone** \*. [s.l: s.n.].

BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: Why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer letters**, [s. l.], 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRANDSMA, I.; VAN GENT, D. C. **Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act**. [s.l: s.n.].

BROMBERG, K. D.; BURGIN, A. B.; OSHEROFF, N. A. Two-drug Model for Etoposide Action against Human Topoisomerase II\*. [s. l.], 2002.

CALAF, G. M. et al. Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs (Review). **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 437–445, 2015.

CAPRANICO, G. et al. Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. **Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 562–9, 1990.

CARVALHO, H. et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 989–94, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107801>>. Acesso em: 8 maio. 2014.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, [s. l.], 2005.

CHAPMAN, J. R. et al. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. **Journal of Cell Science**, [s. l.], 2012.

CHÉDIN, F. Nascent Connections: R-Loops and Chromatin Patterning. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 32, n. 12, 2016.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. Perspective DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Cell Press Chem & Biol**, [s. l.], 2013.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. Molecular Cell Review The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 40, p. 179–204, 2010.

CITRON, M. L. et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. **Journal of clinical oncology : official**

**Journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1431–9, 2003.

COLDWELL, K. E. et al. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 36, n. 16, p. 100, 2008.

CORNAROTTI, M. et al. Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases IIalpha (p170) and IIbeta (p180). **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 50, n. 6, 1996.

COSTA, R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, [s. l.], v. 85, n. 11, p. 1083–1099, 2003.

CRESPI, M. D. et al. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 521–8, 1986.

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 12, p. 801–17, 2012.

CUTTS, S. et al. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 73–81, 2005.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 15, 2017.

DELGADO, J. L. et al. Topoisomerases as Anticancer Targets. **Biochem J.**, [s. l.], 2018.

DERKS, K. W. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; POTHOF, J. The DNA damage response: The omics era and its impact. **DNA Repair**, [s. l.], v. 19, p. 214–220, 2014.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DI MARCO, A.; CASSINELLI, G.; ARCAMONE, F. The discovery of daunorubicin. **Cancer treatment reports**, [s. l.], v. 65 Suppl 4, p. 3–8, 1981.

ESCRIBANO-DÍAZ, C. et al. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 872–883, 2013.

GAO, R. et al. Proteolytic Degradation of Topoisomerase II (Top2) Enables the Processing of Top2DNA and Top2RNA Covalent Complexes by Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) \*. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], 2014.

GATENBY, R. A. et al. Mathematical Oncology Adaptive Therapy. [s. l.], 2009.



GATENBY, R.; BROWN, J. The Evolution and Ecology of Resistance in Cancer Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], 2018.

GAVANDE, N. S. et al. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 160, p. 65–83, 2016.

GERLINGER, M.; SWANTON, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 103, p. 1139–1143, 2010.

GINNO, P. A. et al. R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 814–825, 2012.

GLISSON, B. et al. **Cross-Resistance to Intercalating Agents in an Epipodophyllotoxin-resistant Chinese Hamster Ovary Cell Line: Evidence for a Common Intracellular Target**. [s.l: s.n.].

GOBBINI, E. et al. The MRX complex regulates Exo1 resection activity by altering DNA end structure. **The EMBO Journal**, [s. l.], p. e98588, 2018.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GREENE, J. M.; GEVERTZ, J. L.; SONTAG, E. D. Mathematical Approach to Differentiate Spontaneous and Induced Evolution to Drug Resistance During Cancer Treatment. **JCO clinical cancer informatics**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 1–20, 2019.

HAMPERL, S. et al. Transcription–Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. **Cell**, [s. l.], v. 170, n. 4, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>

HANAWALT, P. C.; FORD, J. M.; LLOYD, D. R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. **Mutation Research**, [s. l.], v. 544, p. 107–114, 2003.

HANAWALT, P. C.; SPIVAK, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 958–70, 2008.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–23, 2014.

HELLEDAY, T. et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 193–204, 2008.

HER, J.; BUNTING, S. F. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks.

[s. l.], v. 2, n. 5, p. 10502–10511, 2018.

HOEIJMAKERS, J. H. J. MOLECULAR ORIGINS OF CANCER DNA Damage, Aging, and Cancer. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 361, p. 1475–85, 2009.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. [s. l.], 2010.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 714–26, 2013.

HOUSMAN, G. Drug resistance in cancer: an overview of the clinical aspects. **Cancers**, [s. l.], v. 1, p. 5–9, 2014.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 1769–92, 2014.

HSIANG, Y.-H.; LIU, L. F. **Identification of Mammalian DNA Topoisomerase I as an Intracellular Target of the Anticancer Drug Camptothecin1**CANCER RESEARCH. [s.l: s.n.].

HSIANG, Y. H. et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 27, p. 14873–8, 1985.

HU, L.-B. et al. Nucleotide Excision Repair Factor XPC Ameliorates Prognosis by Increasing the Susceptibility of Human Colorectal Cancer to Chemotherapy and Ionizing Radiation. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 8, n. July, p. 1–11, 2018.

HUEN, M. S. Y.; SY, S. M. H.; CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 138–148, 2010.

HYNDMAN, I. J. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, [s. l.], 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019**Inca. [s.l: s.n.].

ISONO, M. et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. **CellReports**, [s. l.], v. 18, p. 520–532, 2017.

KAMILERI, I.; KARAKASILIOTI, I.; GARINIS, G. A. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 566–573, 2012.

KREJCI, L. et al. Homologous recombination and its regulation. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], 2012.

LAN, L. et al. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. [s. l.], [s.d.].

LEE, K.-J. et al. Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1732–1745, 2016.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer research**, [s. l.], v. 57, n. 15, p. 3071–8, 1997.

LIAKOS, A.; LAVIGNE, M. D.; FOUSTERI, M. Nucleotide Excision Repair: From Neurodegeneration to Cancer. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] : American Association of Pharmaceutical Scientists, 2017.

LIU, C. et al. A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 6106–6127, 2014.

LÓPEZ, Á. G. et al. The dose-dense principle in chemotherapy. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 430, p. 169–176, 2017.

LOWN, J. W. et al. Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy. **Molecular pharmacology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 178–84, 1984.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. 823–37, 2009.

MANZO, S. G. et al. DNA Topoisomerase I differentially modulates R-loops across the human genome. **genome biology**, [s. l.], 2018.

MAO, Z. et al. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. **DNA Repair**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1765–1771, 2008.

MARINELLO, J. et al. Dynamic Effects of Topoisomerase I Inhibition on R-Loops and Short Transcripts at Active Promoters. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 147053, 2016.

MARINELLO, J.; DELCURATOLO, M.; CAPRANICO, G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2018.

MARTEIJN, J. a et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 465–81, 2014.

MCDEVITT, S. et al. How RNA transcripts coordinate DNA recombination and repair. **Nature Communications**, [s. l.], 2018.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 613–628, 2017.

MCGURK, C. J. et al. Regulation of DNA repair gene expression in human cancer cell lines. **Journal of cellular biochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1121–36, 2006.

MEERS, C.; KESKIN, H.; STORICI, F. DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question. **DNA Repair**, [s. l.], v. 44, p. 17–21, 2016.

MENCK, C. F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and molecular biology**, [s. l.], v. 37, n. 1 Suppl, p. 220–33, 2014.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines : Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. [s. l.], v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004.

MIRZAEI, H. R. et al. Clinical Study Dose-Dense Epirubicin and Cyclophosphamide Followed by Docetaxel as Adjuvant Chemotherapy in Node-Positive Breast Cancer. **International Journal of Breast Cancer**, [s. l.], v. 2013, 2013.

MORAES, M. C. S. et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. **Cancer letters**, [s. l.], v. 314, n. 1, p. 108–18, 2012.

MYLER, L. R. et al. Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 891–898.e4, 2017.

NAJAR, I. A.; JOHRI, R. K. Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide. **Journal of biosciences**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 139–44, 2014.

NAKANISHI, N. et al. Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions. [s. l.], 2012.

NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. CHEMICAL APPROACHES TO THE DISCOVERY AND DEVELOPMENT OF CANCER THERAPIES. [s. l.], 2005.

NETO, M. **GUIA DE PROTOCOLOS E MEDICAMENTOS para Tratamento em Oncologia e Hematologia**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guias-e-protocolos/Documents/Guia\\_Oncologia\\_Einstein\\_2013.pdf](https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guias-e-protocolos/Documents/Guia_Oncologia_Einstein_2013.pdf)>. Acesso em: 3 abr. 2019.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 338–50, 2009.

NITISS, J. L.; NITISS, K. C. Tdp2: A Means to Fixing the Ends. **PLoS Genetics**, [s. l.], 2013.

OLIVEIRA SILVA, A. et al. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. [s. l.], 2016.

PARKER, B. S. et al. **Formaldehyde activation of mitoxantrone yields CpG and CpA specific DNA adducts** *Nucleic Acids Research*. [s.l: s.n.].

PARKER, B. S.; CULLINANE, C.; PHILLIPS, D. R. Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 27, n. 14, p. 2918–23, 1999.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Cell Press**, [s. l.], 2009.

POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. **Chemical reviews**, [s. l.], v. 109, n. 7, p. 2894–902, 2009.

POMMIER, Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & biology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 421–33, 2010.

POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. **ACS chemical biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 82–95, 2013.

POMMIER, Y. et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). **DNA Repair**, [s. l.], v. 19, p. 114–129, 2014.

POMMIER, Y. et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 703–721, 2016.

REINHARDT, F. et al. Navigation through inter- and intratumoral heterogeneity of endocrine resistance mechanisms in breast cancer: A potential role for Liquid Biopsies? **Tumor Biology**, [s. l.], v. 39, n. 11, 2017.

REITER, J. G. et al. The effect of one additional driver mutation on tumor progression. **Evolutionary Applications**, [s. l.], 2012.

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**, [s. l.], v. 768, p. 68–77, 2016. a.

ROCHA, J. C. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL CENTRO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR TESE DE DOUTORADO INFLUÊNCIA DO REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS NA CITOTOXICIDADE DO ANTINEOPLÁSICO MITOXANTRONA**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143821/000992550.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

ROCHA, J. C. et al. Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity. **DNA Repair**, [s. l.], v. 42, p. 33–43, 2016. b.

ROPOLO, M. et al. Defective resolution of  $\gamma$ H2AX foci and enhanced DNA breakage in ionizing radiation-treated cockayne syndrome B cells. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 272–276, 2011.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? **Bioscience reports**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 875–888, 2013.

SAFFI, J. et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. **DNA repair**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 40–7, 2010.

SAKAI, A. et al. PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks. **Genes & genetic systems**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 265–72, 2012.

SANTOS-PEREIRA, J. M.; AGUILERA, A. **R loops: New modulators of genome dynamics and function**, 2015.

SARASIN, A.; STARY, A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. **DNA repair**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 265–9, 2007.

SCHÄRER, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, [s. l.], 2013.

SHAHAR, O. D. et al. Live imaging of induced and controlled DNA double-strand break formation reveals extremely low repair by homologous recombination in human cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 31, p. 3495–3504, 2012.

SHIBATA, A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 803–805, p. 51–55, 2017.

SILVA, A. O. et al. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 13743–13749, 2016.

SIMON, R.; NORTON, L. The Norton-Simon hypothesis: designing more effective and less toxic chemotherapeutic regimens. **Nature clinical practice. Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 406–7, 2006.

SKLADANOWSKI, A.; KONOPA, J. Mitoxantrone and ametantrone induce interstrand cross-links in DNA of tumour cells. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 82, n. 7, p. 1300–4, 2000.

SOLLIER, J. et al. Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair Factors Promote R-Loop-Induced Genome Instability. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 777–785, 2014.

SOTTILE, M. L.; NADIN, S. B. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 303–315, 2018.

SPIVAK, G. Nucleotide excision repair in humans. **DNA Repair**, [s. l.], v. 36, p. 13–18, 2015.

STEURER, B.; MARTEIJN, J. A. Traveling Rocky Roads: The Consequences of Transcription-Blocking DNA Lesions on RNA Polymerase II. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 429, n. 21, p. 3146–3155, 2017.

SUNG, P. Introduction to the Thematic Minireview Series : DNA double-strand break repair and pathway choice. **JBC**, [s. l.], v. 293, p. 10500–10501, 2018.

SWIFT, L. P. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer research**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 4863–71, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651442>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 219–34, 2006.

TENG, Y. et al. ROS-induced R loops trigger a transcription-coupled but BRCA1/2-independent homologous recombination pathway through CSB. **Nature Communications**, [s. l.], 2018.

TEWEY, K. M. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 226, n. 4673, p. 466–8, 1984.

VANOOSTHUYSE, V. Strengths and Weaknesses of the Current Strategies to Map and Characterize R-Loops. **Non-Coding RNA**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 9, 2018.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. [s. l.], v. 25, 2014.

WEI, L. et al. DNA damage during the G0/G1 phase triggers RNA-templated, Cockayne syndrome B-dependent homologous recombination. **PNAS**, [s. l.], 2015.

WEI, L.; LEVINE, A. S.; LAN, L. Transcription-coupled homologous recombination after oxidative damage. **DNA Repair**, [s. l.], v. 44, p. 76–80, 2016.

WHITE, R. J.; DURR, F. E. Development of mitoxantrone. **Investigational new drugs**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 85–93, 1985.

WILSTERMANN, A. M.; OSHEROFF, N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. **Current topics in medicinal chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 321–38, 2003.

WOOD, R. D. Review Article Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. [s. l.], v. 526, n. March, p. 520–526, 2010.

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W.-D. Homologous recombination and the

repair of DNA Double-Strand Breaks. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 293, p. jbc.TM118.000372, 2018.

YAN, H.; TAMMARO, M.; LIAO, S. Collision of trapped topoisomerase 2 with transcription and replication: Generation and repair of DNA double-strand breaks with 5' adducts. **Genes**, [s. l.], v. 7, n. 7, 2016.

YOU, X. et al. Subcellular distribution of RAD23B controls XPC degradation and DNA damage repair in response to chemotherapy drugs. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 36, p. 108–116, 2017.



## CURRICULUM VITÆ resumido

BUSATTO, F.F.

### DADOS PESSOAIS

**Nome:** Franciele Faccio Busatto

**Local e data de nascimento:** Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil  
09/03/1990

**Endereço profissional:** Rua Sarmiento Leite, 245 – Anexo III Laboratório 714  
Centro, Porto Alegre  
90050-170, RS - Brasil

**Telefone profissional:** +55 51 33038861

**E-mail:** [franbusatto@gmail.com](mailto:franbusatto@gmail.com)

### FORMAÇÃO

- 2015 - 2019**      Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Com período sanduíche em Université Laval (Orientador: Jean-Yves Masson)  
Orientador: Jenifer Saffi  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2015**      Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Influência de Mecanismos de Resposta a Danos no DNA na Resistência de Células de Leucemia ao Antineoplásico Mitoxantrona,  
Ano de obtenção: 2015  
Orientador: Jenifer Saffi  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2014**      Especialização em Farmacologia e Toxicologia.  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Inibidores de Topoisomerase e a sua Relação com o reparo de DNA  
Orientador: Jenifer Saffi
- 2009 - 2012**      Graduação em Biomedicina.  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil  
Título: Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona  
Orientador: Jenifer Saffi

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

### **Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS**

**2015 - 2019** Vínculo: Doutorando – bolsista CAPES

**2013 - 2015** Vínculo: Mestrando – bolsista CAPES

### **Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA**

**2016 - 2016** Vínculo: Estágio docente  
Estágio docente na disciplina de Bioquímica para o curso de Farmácia sob orientação da professora Jenifer Saffi

**2013 - 2013** Vínculo: Estágio docente  
Estágio docente na disciplina de Bioquímica para os cursos de Biomedicina, Farmácia e Toxicologia Analítica sob orientação da professora Jenifer Saffi

**2010 - 2010** Vínculo: Monitora de Histologia/Embriologia  
Monitora de Histologia/Embriologia para o curso de Fisioterapia

**2011 - 2012** Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica no laboratório de Genética Toxicológica sob orientação da professora Jenifer Saffi

**2010 - 2011** Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica no laboratório de Biologia Molecular sob orientação da professora Silvana de Almeida

**2010 - 2010** Vínculo: Monitora de Citologia  
Monitoria de Citologia para o curso de Biomedicina

### **Hospital Moinhos de Vento - HMV**

**2012 - 2012** Vínculo: Estágio curricular  
Outras informações: Estágio curricular no Instituto de Educação e Pesquisa - Pesquisa Clínica do Hospital Moinhos de Vento.

### **Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA**

**2012 - 2012** Vínculo: Estágio Curricular  
Outras informações: Estágio Curricular no laboratório de Citogenética Humana do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

### **Centro Universitário São Camilo - USC**

**2016 - 2016** Vínculo: Professor Visitante  
Outras informações: Professor da disciplina de Farmacologia para o curso técnico em Podologia

## PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- 2019** Prêmio Giorgio Schreiber – melhor apresentação de trabalho oral na sessão “Genomic Instability and DNA repair” do XIV Congresso da Mutagen Brasil
- 2018** Melhor apresentação de poster no VI FARM-DNA (Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis) - "Topoisomerase II Inhibitors-Induced Lesions - at the crossroads between NER and DSB Repair Pathways", Fundação Danilo Pena
- 2012** Trabalho Destaque na categoria Iniciação Científica da I Semana Acadêmica e V Semana Científica, UFCSPA
- 2012** Trabalho Destaque na categoria Inovação Tecnológica da I Semana Acadêmica e V Semana Científica, UFCSPA
- 2011** Trabalho Destaque da IV Semana Científica da UFCSPA: Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona, UFCSPA

## ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. MERSAOUI, SOFIANE Y; YU, ZHENBAO; COULOMBE, YAN; KARAM, MARTIN; **BUSATTO, FRANCIELE F**; MASSON, JEAN-YVES; RICHARD, STÉPHANE.

Arginine methylation of the DDX5 helicase RGG/RG motif by PRMT5 regulates resolution of RNA/DNA hybrids. The EMBO Journal. In press. 2019.

2. PORTICH, JÚLIA PLENTZ; DOS SANTOS, RAFAEL PEREIRA; KERSTING, NATHALIA; JORGE, KAROLINA BROCHADO; CASAGRANDE, PIETRO REBELO; DOS SANTOS COSTA, GABRIELA; DIAS CIONEK, JÉSSICA MARIA GONÇALVES; OLGUINS, DANIELLY BRUFATTO; SINIGAGLIA, MARIALVA; **BUSATTO, FRANCIELE FACCI**O; SAFFI, JENIFER; MALUF, SHARBEL WEIDNER; LOSS, JISEH FAGUNDES; BRUNETTO, ALGEMIR LUNARDI; ROESLER, RAFAEL; DE FARIAS, CAROLINE BRUNETTO

DNA damage response in patients with pediatric Acute Lymphoid Leukemia during induction therapy. LEUKEMIA RESEARCH. , v.54, p.59 - 65, 2017.

3. BIANCINI, GIOVANA BRONDANI; MORÁS, ANA MOIRA; REINHARDT, LUIZA STEFFENS; **BUSATTO, FRANCIELE FACCI**O; DE MOURA SPEROTTO, NATHALIA DENISE; SAFFI, JENIFER; MOURA, DINARA JAQUELINE; GIUGLIANI, ROBERTO; VARGAS, CARMEN REGLA

Globotriaosylsphingosine induces oxidative DNA damage in cultured kidney cells. NEPHROLOGY. , v.22, p.490 - 493, 2017.

4. ROCHA, JAQUELINE CESAR; **BUSATTO, FRANCIELE FACCI**O; DE SOUZA, LISIANE KNOB; SAFFI, JENIFER

Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity. DNA Repair (Print). , v.42, p.33 - 43, 2016.

5. ROCHA, JAQUELINE C.; **BUSATTO, FRANCIELE F.**; GUECHEVA, TEMENOUGA N.; SAFFI, JENIFER  
Role of nucleotide excision repair proteins in response to DNA damage induced by topoisomerase II inhibitors. Mutation Research. Reviews in Mutation Research (Print). , v.768, p.68 - 77, 2016.

## **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

1. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; MASSON, JY; SAFFI, JENIFER. Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways In: XIV Congresso da Mutagen Brasil, Bento Gonçalves, RS, Brazil, 2019.

2. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; VIERO, V. P.; SAFFI, JENIFER. DNA Repair Modulation in Human Breast Cancer Cells Submitted to a Clinical Chemotherapy Protocol In: VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018, São Paulo. **Abstract Book.** , 2018.

3. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; VIERO, V. P.; SAFFI, JENIFER. DNA Repair Modulation in Human Breast Cancer Cells Submitted to a Clinical Chemotherapy Protocol In: I International Symposium on Molecular Genetics of Breast Cancer, 2018, São Paulo. **Abstract Book.** , 2018.

4. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; VIERO, V. P.; ROCHA, JAQUELINE CESAR; MASSON, JY; SAFFI, JENIFER. Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways In: 2018 International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. **Abstract Book.** , 2018.

5. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; VIERO, V. P.; ROCHA, JAQUELINE CESAR; MASSON, JY; SAFFI, JENIFER. Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways In: VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018, São Paulo. **Abstract Book.** , 2018.

6. **BUSATTO, F. F.**; VIERO, V. P.; ROCHA JC; MASSON, JY; SAFFI J. Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways In: Gordon Research Conference on DNA Topoisomerases in Biology and Medicine, 2018, South Hadley, MA, USA. **Abstract book.** , 2018.

7. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; VIERO, V. P.; ROCHA, JAQUELINE C.; SAFFI, JENIFER. Influence of DNA Damage Response Mechanisms in Leukemia cells Resistant to the Antineoplastic Mitoxantrone In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. **Abstract Book.** , 2015.

8. DE SOUZA, LISIANE KNOB; ROCHA, JAQUELINE CESAR; **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; SAFFI J. Influence of Nucleotide Excision Repair in Citotoxicity of Topoisomerase II Inhibitors In: 1st Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2014, Porto Alegre. **Abstract Book.** , 2014.

9. ROCHA JC; **BUSATTO, F. F.**; DE SOUZA, LISIANE KNOB; SAFFI J. MITOXANTRONE INDUCES LESIONS THAT ARE RECOGNIZED BY TRANSCRIPTION-COUPLED NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR PATHWAY In: 1st Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2014, Porto Alegre. **Abstract Book.** , 2014.

10. BUSATTO, F. F.; ROCHA JC; SAFFI J. INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY In: 11th International Conferences on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu. **Program and Abstract Book of the 11th International Conferences on Environmental Mutagens.** , 2013. v.1. p.264 - 265

11. **BUSATTO, FRANCIELE FACCIO**; ROCHA, JAQUELINE C.; SAFFI, JENIFER. Influence of Nucleotide Excision Repair Machinery in Mitoxantrone Citotoxicity In: V Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2013, São Paulo. **Abstract book.** , 2013.

12. ROCHA JC; BUSATTO, F. F.; SAFFI J. Mitoxantrone induces lesions that are recognized by transcription-coupled nucleotide excision repair In: 11th International Conferences on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu. **Program and Abstract Book of the 11th International Conferences on Environmental Mutagens.** , 2013. v.1. p.266 - 267

13. BUSATTO, F. F.; ROCHA JC; SAFFI J. INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos.** , 2012.

14. BUSATTO, F. F.; ROCHA JC; SAFFI J. Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona In: VII Salão de Iniciação Científica e Extensão e I Mostra da Pós-Graduação, 2012, Porto Alegre. **Revista Ciência em Movimento.** , 2012.

## **ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES**

### **Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Victoria Pereira Viero. *Análise do perfil de crescimento celular e modulação da via de reparo por excisão de nucleotídeos em células de câncer de mama submetidas a um protocolo clínico quimioterápico (co-orientador).* 2018. Curso (Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

2. Paula Pellenz Tomasini. *Avaliação do efeito modulador do óleo essencial de Piper gaudichaudianum na citotoxicidade da doxorubicina (coorientador).* 2015. Curso (Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

## Iniciação científica

1. Victoria Pereira Viero. *Análise do perfil de crescimento celular e modulação da via de reparo por excisão de nucleotídeos em células de câncer de mama submetidas a um protocolo clínico quimioterápico (co-orientador)*. 2018. Iniciação científica (Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. Victoria Pereira Viero. *Influência de Mecanismos de Resposta a Danos no DNA na Resistência de Células de Leucemia ao Antineoplásico Mitoxantrona (coorientador)*. 2014. Iniciação científica (Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. Apresentação oral e Poster / no **XIV Congresso da Mutagen Brasil, Bento Gonçalves, RS, Brazil, 2019**, 2019. (Congresso)  
Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2018 International Congress of Genetics**, 2018. (Congresso)  
Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways.
3. **DNA Topoisomerases in Biology and Medicine (Gordon Research Seminar - GRS)**, 2018. (Seminário)  
Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Gordon Research Conference on DNA Topoisomerases in Biology and Medicine**, 2018. (Encontro)  
Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I International Symposium on Molecular Genetics of Breast Cancer**, 2018. (Simpósio)  
DNA repair modulation in human breast cancer cells submitted to a clinical chemotherapy protocol.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, VI FARM-DNA**, 2018. (Encontro)  
DNA repair modulation in human breast cancer cells submitted to a clinical chemotherapy protocol.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, VI FARM-DNA**, 2018. (Encontro)  
Topoisomerase II inhibitors-induced lesions - at the crossroads between NER and DSB repair pathways.
8. Conferencista no(a) **II Curso de Verão de Toxicidade Genética**, 2017. (Encontro)  
Metodologias de avaliação de danos e reparo de DNA.
9. **XII Congresso da Mutagen-Brasil**, 2016. (Congresso)

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBBBq)**, 2015. (Congresso)  
Influence Of Dna Damage Response Mechanisms In Leukemia Cells Resistant To The Antineoplastic Mitoxantrone.
11. **I Curso de Toxicidade Genética: Causas, Consequências e Ensaios Pré-clínicos, módulos I, II e III**, 2015. (Outra)
12. **IX Congresso Brasileiro de Biossegurança**, 2015. (Congresso)
13. **Mini Curso em Eficiência e Manutenção de Cabines de Segurança Biológica**, 2015. (Outra)
14. **Mini Curso em Princípios de Contenção e Desenho de Laboratórios Nível 3 e 4 I 4**, 2015. (Outra)
15. **The Best of ASCO**, 2015. (Simpósio)
16. Apresentação de Poster / Painel no(a) **International Conference on Environmental Mutagens**, 2013. (Congresso)  
INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Meeting in Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis**, 2013. (Encontro)  
INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Congress of SBMCTA and IX Congress of ALAMCTA**, 2013. (Congresso)  
INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MACHINERY IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10º Congresso Internacional de Biologia Celular**, 2012. (Congresso)  
INFLUENCE OF NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN MITOXANTRONE CITOTOXICITY.
20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Semana Científica da UFCSPA**, 2012. (Outra)  
Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.
21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Salão de Iniciação Científica e Extensão e I Mostra da Pós-Graduação**, 2012. (Outra)  
Influência do Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.
22. **XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS**, 2012. (Outra)  
Influência do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) na Citotoxicidade do Antineoplásico Mitoxantrona.

23. **Encontro Internacional em terapia Celular e Engenharia de Tecidos**, 2011. (Seminário)
24. **II Simpósio de Pesquisa Clínica**, 2011. (Simpósio)
25. **IV Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas da UFCSPA**, 2011. (Outra)
26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação**, 2011. (Outra)  
Farmacogenética dos Inibidores da HMG-CoA Redutase: Avaliação da Influência de Variantes de Genes Relacionados à Ação do Estrógeno na Resposta Hipolipemiante e no Desenvolvimento de Efeitos Adversos.
27. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Semana Científica da UFCSPA**, 2010. (Outra)  
Trabalhando na prevenção de incêndio através da capacitação de funcionários da UBS e da comunidade local.
28. **V Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular**, 2010. (Congresso)
29. **VI Jornada Acadêmica de Biomedicina UFCSPA e II Simpósio: Habilitações da Biomedicina**, 2010. (Simpósio)
30. **XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2010. (Congresso)
31. **Curso de Perícia Criminal (Toxicologia Forense)**, 2009. (Outra)
32. **Feiras de Saúde da UFCSPA**, 2009. (Oficina)
33. **I Ciclo de Palestras sobre saúde e Meio Ambiente da UFCSPA**, 2009. (Outra)
34. **II Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas das UFCSPA**, 2009. (Outra)
35. **II Semana Científica da UFCSPA**, 2009. (Outra)
36. **III Curso de Abordagem às Emergências Cotidianas - Liga do Trauma UFCSPA**, 2009. (Outra)
37. **V Jornada Acadêmica da Biomedicina e I Simpósio: Habilitação da Biomedicina da UFCSPA**, 2009. (Simpósio)
38. **VII Simpósio de Patologia Clínica - Aplicações da Patologia Clínica: uma visão global**, 2009. (Simpósio)

## **ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

1. SAFFI J; MOURA, D. J.; MORAS, A. M.; STEFFENS, L. R.; VIAU, C. M.; HENN, J.; BUSATTO, F. F.; ROSA, H. T.  
**I Curso de Toxicidade Genética: Causas, Consequências e Ensaio Pré-clínicos, módulos I, II e III**, 2015. (Outro, Organização de evento)