

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

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA E SENESCÊNCIA EM FIBROBLASTOS
HUMANOS DEFICIENTES NO REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS
TRATADOS COM DOXORRUBICINA**

LARISSA MILANO DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2014.

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

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA E SENESCÊNCIA EM FIBROBLASTOS
HUMANOS DEFICIENTES NO REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS
TRATADOS COM DOXORRUBICINA**

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

Larissa Milano de Souza

Orientadora: Dra. Jenifer Saffi

Co-orientador: Dr. Guido Lenz

PORTO ALEGRE, 2014.

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Reparação de Eucariontes e do Laboratório de Sinalização Celular do departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico esta dissertação à minha mãe,
pelo exemplo de resiliência e força.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que em algum momento me ajudaram no decorrer deste projeto.

Primeiramente agradeço a minha orientadora Jenifer Saffi, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Reparação de DNA, pela confiança e pelos mais de 6 anos de orientação, que foram de grande importância pra construção da minha maturidade e independência.

Ao meu co-orientador professor Guido Lenz, pelas conversas sinceras científicas ou até mesmo psicológicas, pelo apoio e estímulo pra levar este projeto adiante.

Agradeço a minha comissão de acompanhamento, os professores Diego Bonatto e a Nusha, pelas críticas e sugestões no decorrer do trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas e ex-colegas do Laboratório Reparação de DNA de Eucariontes, pela paciência e companhia ao longo da graduação e do mestrado.

À Michele Lima e a Bruna Castilhos, pela amizade e por me aturarem dentro e fora do lab. À Clara Charlier, que faz uma falta imensa no dia-a-dia, mas se mantém sempre presente ainda que em Guilford. Aos hoje não mais alunos de pós-graduação, Ana Arigony, Diana Bordin, Dinara Moura, Iuri Oliveira e Miriana Machado, pelas trocas de ideias científicas ou não, e pela confiança na minha capacidade.

À todos que passaram pelo lab nos últimos anos, que foram companheiros e que permitiram um convívio agradável para trabalhar: Vick, Ju, Lyda, Joel, Grethel, Cris, André, Fer, Rê, Pati...todos que por ventura eu tenha esquecido. À minha ex-IC Stephanie, por me mostrar o quão paciente eu posso ser. Aos meninos do Labsinal, pelas eventuais ajudas aqui e ali.

Ao pessoal do departamento de biofísica, especialmente à Iranez por todas as caronas, e almoços em finais de semana no lab, e ao Fabiano pela amizade de longa data.

À todos os meus amigos que suportam o meu temperamento e a minha *constante* ausência, e que reclamam que eu preciso escrever, que tem experimento no final de semana, que eu não durmo, que eu nunca posso...Especialmente à Lívia, pelos mais de 15 anos de amizade, e pela semana lavando a minha louça e ao Rapha pelo companheirismo e prestatividade.

Agradeço à banca pela disponibilidade e colaboração.

Agradeço à Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo pela ajuda para tirar as

dúvidas sempre que necessitei, e pela agilidade. Agradeço ao CNPq, FAPERGS pelo apoio financeiro.

Agradeço a minha família, especialmente ao meu irmão e a minha mãe pelo apoio, incentivo e confiança, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

E por último, agradeço à todas que de alguma forma me ajudaram. Foi um ano complicado, e quando eu perdi quase tudo pude contar com a solidariedade, com as doações de todas as formas, e principalmente com o carinho e apoio de todos. Não fosse isso, teria sido *quase impossível* seguir em frente.

if you're going to try,
go all the way.
otherwise, don't even start.
this could mean losing girlfriends,
wives, relatives, jobs and
maybe your mind.
it could mean not eating for 3 or 4 days.
it could mean freezing on a
park bench.
it could mean jail,
it could mean derision,
it could mean mockery,
isolation.
isolation is the gift,
all the others are a test
of your endurance,
of how much you really want to
do it.
and you'll do it
despite rejection and the worst odds
and it will be better than
anything else
you can imagine.
if you're going to try,
go all the way.
there is no other feeling like that.
you will be alone with the gods
and the nights will flame with fire.
you will ride life
straight to perfect laughter,
it's the only good fight there is.

Charles Bukowski

'learning how to think really means learning how to exercise some control over how and what you think. It means being conscious and aware enough to choose what you pay attention to and to choose how you construct meaning from experience. Because if you cannot exercise this kind of choice in adult life, you will be totally hosed. Think of the old cliché about "the mind being an excellent servant but a terrible master".'

David Foster Wallace

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS (NER).....	19
3. DOXORRUBICINA	26
4. AUTOFAGIA.....	28
4. 1 MECANISMOS MOLECULARES.....	31
5. SENESCÊNCIA.....	33
6. A POSSÍVEL TRANSIÇÃO AUTOFAGIA- SENESCÊNCIA.....	37
HIPÓTESE.....	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÕES.....	76
PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO I.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Danos ao DNA, vias de reparo e respostas celulares.

Figura 2. Mecanismos moleculares do NER.

Figura 3 . Pacientes com XP , TTD e CS.

Figura 4. Estrutura química da Doxorubicina.

Figura 5. Representação esquemática dos passos de autofagia em células de mamíferos.

Figura 6. Cultura de MRC5 contendo célula senescentes.

Figura 7. Mecanismos moleculares da senescência celular.

LISTA DE ABREVIATURAS

AO	<i>Acridina Orange</i> (Laranja de acridina)
ATGs	<i>Autophagy-related protein</i> (Proteínas relacionadas à autofagia)
AVOs	<i>Acidic vacuolar organelles</i> (Organelas acídicas vacuolares)
BER	<i>Base excision repair</i> (Reparo por excisão de bases)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina bovina sérica)
CAK	<i>CDK-activating kinase</i> (Cinase ativadora de CDK)
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Cinases Dependentes de Ciclinas)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
CPD	Ciclobutano Pirimidina
CS	<i>Cockayne syndrom</i> (Síndrome de Cockayne)
DOX	<i>Doxorubicin</i> (Doxorrubicina)
DSBs	<i>Double-strand breaks</i> (Quebras de fita dupla)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GGR	<i>Global genome repair</i> (Reparo do Genoma Global)
HR	<i>Homologous recombination</i> (Recombinação homóloga)
LC3	<i>Light Chain 3 of microtubule-associated protein</i> (Cadeia leve 3 da proteína associada ao microtúbulo)
MMR	<i>Mismatch repair</i> (Reparo de bases mal emparelhadas)
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos)
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> (Reparo por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i> (Recombinação não-homóloga)
NMA	<i>Nuclear morphology analysis</i> (Análise de morfologia nuclear)
OIS	<i>Oncogene-induced senescence</i> (Senescência induzida por

oncogenes)

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
PDT	<i>Population doubling time</i> (Tempo de duplicação da população)
PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídeo)
PI3K III	<i>Phosphoinositide Kinase-3 class III</i> (Fosfatidilinositol 3-cinase classe 3)
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i> (Fosfatidilinositol-3-fosfato)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (Fosfatase homóloga a tensina)
p38 MAPK α	<i>p38 mitogen-activated protein kinase α</i> (<i>Proteína cinase ativada por mitógeno p38</i>)
RFC	<i>Replication factor C</i> (Fator de Replicação C)
SA- β -gal	<i>Senescence-associated-β-galactosidase</i> (β -galactosidase associada à Senescência)
SFB	Soro fetal bovino
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i> (Focos heterocromáticos associado à senescência)
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i> (Fenótipo secretório associado a senescência)
TCR	<i>Transcription Coupled Repair</i> (<i>Reparo acoplado à transcrição</i>)
TFIIH	Transcription factor IIH (Fator de Transcrição IIH)
Topo II	<i>Topoisomerase II</i>
TTD	Tricotriodistrofia
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

RESUMO

Doxorrubicina (DOX) é um agente importante na terapia antitumoral. Seu mecanismo de ação inclui inibição de topoisomerase II, formação de radicais livres e adutos de DNA. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) atua removendo lesões que distorcem a dupla hélice do DNA, como as induzidas por UV e agentes químicos. Linhagens celulares deficientes em NER são mais sensíveis às antraciclinas. Porém, pouco se sabe sobre os processos celulares que permitem sobrevivência celular destas linhagens após o tratamento com esta classe de drogas. Neste trabalho verificou-se a resposta celular às lesões induzidas por DOX em linhagens celulares de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes em NER (CSB, XPA, XPC e XPD). Para esta finalidade foram realizados os ensaios de MTT, anexina-V, laranja de acridina e SA- β -galactosidase. Além disso, a dinâmica do ciclo celular e PDT (population doubling time) foram determinados após 72 horas de tratamento com DOX. Os resultados indicam que as linhagens deficientes em NER são mais sensíveis à DOX e morrem de maneira dose-dependente, principalmente por apoptose. Na análise do ciclo celular, a linhagem proficiente MRC5 e a linhagem deficiente em XPA apresentaram maior porcentagem de células na fase G2/M. No entanto, as linhagens CSB e XPD não apresentaram aumento relevante. Quando a linhagem XPD foi complementada com gene XPD funcional uma parada em G2 foi observada apenas em baixas doses de DOX. No ensaio PDT, houve um aumento do número de horas necessárias para a duplicação das células MRC5 e XPA tratadas com DOX, enquanto células CSB e XPD não mostraram uma mudança relevante no tempo necessário para a duplicação celular. Isto indica que estas células prosseguem através do ciclo celular, mesmo após o tratamento com DOX. No ensaio de SA- β -galactosidase, as linhagens MRC5, XPA e XPC entraram em senescência após tratamento com DOX, enquanto CSB e XPD não foram induzidas neste processo. Estes resultados foram confirmados por análise de Western Blot, onde as células CSB e XPD não apresentam diferença nos níveis de expressão de p21 e p16 (marcadores de senescência), em resposta ao tratamento com DOX. Em conjunto com a parada em G2/M e indução da senescência, as células MRC5 e XPA mostraram um aumento na coloração com laranja de acridina, indicando o processo de autofagia, enquanto que as células CSB e XPD não demonstraram este aumento. Um indício importante vem de estudos recentes que ligam a

autofagia com o início da senescência. Assim, autofagia e senescência podem ser parte do mesmo processo fisiológico, conhecido como transição autofagia-senescência. Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que a autofagia e senescência tendem a ocorrer em paralelo, e que autofagia pode ser necessária para o fenótipo senescente. Além disso, pode-se inferir uma participação ativa do NER no reparo de lesões induzidas pela DOX. Assim, NER eficiente após o tratamento com DOX parece ser essencial para a sobrevivência da célula. Por outro lado, o recrutamento de fatores da via de NER (CSB e XPD) parece ser necessário para a indução de respostas celulares específicas, tais como a transição autofagia-senescência.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an important agent in cancer therapy and its mechanism of action includes topoisomerase II-poisoning, free radicals release and DNA adducts formation. The nucleotide excision repair (NER) participates in the removal of lesions that distort the double helix of DNA induced by UV and chemicals. Cell lines deficient in NER are more sensitive to anthracyclines, however little is known about the cellular processes that permit cell survival after treatment with these drugs. In this work we verified the cellular response to DOX induced lesions in human fibroblasts cell lines proficient (MRC5) and deficient in NER (CSB, XPA, XPC and XPD). For this purpose we performed MTT, Annexin-V, Acridine orange and SA- β -galactosidase assays. In addition, the cell cycle dynamics and PDT (*population doubling time*) was determined after 72h DOX treatment. The results indicate that cell lines deficient in NER are more sensitive to anthracyclines and die in a dose dependent manner mainly by apoptosis. In the cell cycle analysis, a proficient MRC5 and XPA deficient cell lines showed a higher percentage of cells in G2/M phase. In contrast, CSB and XPD cells showed no relevant increase. When XPD cells were complemented with functional XPD gene a G2 arrest was observed just at low doses of DOX. In PDT assay, there was an increased number of hours required for doubling in MRC5 and XPA cells treated with DOX, whereas CSB and XPD lines did not show a relevant change in time required for cell duplication. This indicates that these cells proceed through the cell cycle even after treatment with DOX. In SA- β -galactosidase assay, MRC5, XPA and XPC lines entered in senescence after DOX treatment, while CSB and XPD do not induced in this process. These results were confirmed by Western Blot analysis where CSB and XPD cells do not exhibit difference in p21 and p16 expression levels (senescence markers) in response to treatment DOX. Along with the G2/M arrest and senescence induction, MRC5 and XPA cells showed an increase in acridine orange staining, indicating autophagy process, whereas CSB and XPD cells do not demonstrate this increase. An important clue comes from recent studies linking autophagy with the onset of senescence. Thus, autophagy and senescence may be part of the same physiological process, known as the autophagy-senescence transition. Taken together, our findings suggest that autophagy and senescence tend to occur in parallel, and that autophagy may be required for the senescent phenotype. Furthermore, we can infer an active involvement of NER in the

repair of DOX-induced lesions. Thus, efficient NER following treatment with DOX seems to be essential for cell survival. On the other hand, recruitment of NER pathway factors (CSB and XPD) seems to be necessary for induction of specific cellular responses such as autophagy-senescence transition.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

No ambiente em que vivemos somos continuamente expostos a uma série de insultos exógenos e endógenos. Insultos endógenos podem ser decorrentes, por exemplo, de reações metabólicas como a respiração oxidativa, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou modificações químicas espontâneas. Por outro lado no ambiente, fatores como luz UV, radiação ionizante, quimoterápicos e outros agentes químicos decorrentes da poluição do ar e da fumaça do cigarro induzem uma infinidade de lesões no DNA. As células, sendo estruturas complexas e dinâmicas, podem interagir com estes agentes o que pode acarretar em lesões no DNA (DIDERICH, ALANAZI e HOEIJMAKERS, 2011).

A molécula de DNA é indispensável para a célula, sendo o único polímero celular que não é degradado ou reciclado. É nele que fica armazenado o conteúdo biológico informacional necessário para a síntese dos demais polímeros celulares (RNA, proteínas, polissacarídeos, entre outros) e o qual posteriormente será o responsável por determinar as respostas ao meio (MITCHELL, HOEIJMAKERS e NIEDERNHOFER, 2003).

Dada a complexidade dos organismos e a necessidade da transmissão da informação genética, evolutivamente, foram selecionados diversos mecanismos de eliminação destas lesões, permitindo-nos conviver com esses insultos e prosseguir com a vida no ambiente (EISEN e HANAWALT, 1999). Uma maquinaria complexa é composta por um conjunto de proteínas que detectam e reparam os danos no DNA. Estas proteínas controlam o ciclo celular e ativam a sinalização para morte ou senescência celular, mantendo a integridade genômica e impedindo que o DNA danificado seja propagado para as células filhas (VIJG, 2014). Na falha destes, as células acabam acumulando mutações que podem levar, por exemplo, a uma série de doenças complexas caracterizadas por atraso no desenvolvimento, suscetibilidade ao câncer e envelhecimento prematuro (Figura 1)(HOEIJMAKERS, 2009).

O processo de reparação de DNA envolve uma soma de vias que corrigem lesões de acordo com o tipo, envolvendo mecanismos complexos com diversas proteínas de diferentes funções, as quais frequentemente estão sobrepostas e interconectadas com outros processos celulares (KROKAN, KAVLI e SLUPPHAUG, 2004). Além de

mecanismos de reparação direta, pelo menos quatro principais vias de reparação de DNA atuam em mamíferos: Reparo por excisão de bases (*base excision repair*, BER), por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER), reparo de bases mal emparelhadas (*mismatch repair*, MMR) e reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination*, HR) e não homóloga (*non-homologous end-joining*, NHEJ) (HOEIJMAKERS, 2001, ABBOTTS, THOMPSON, e MADHUSUDAN, 2014).

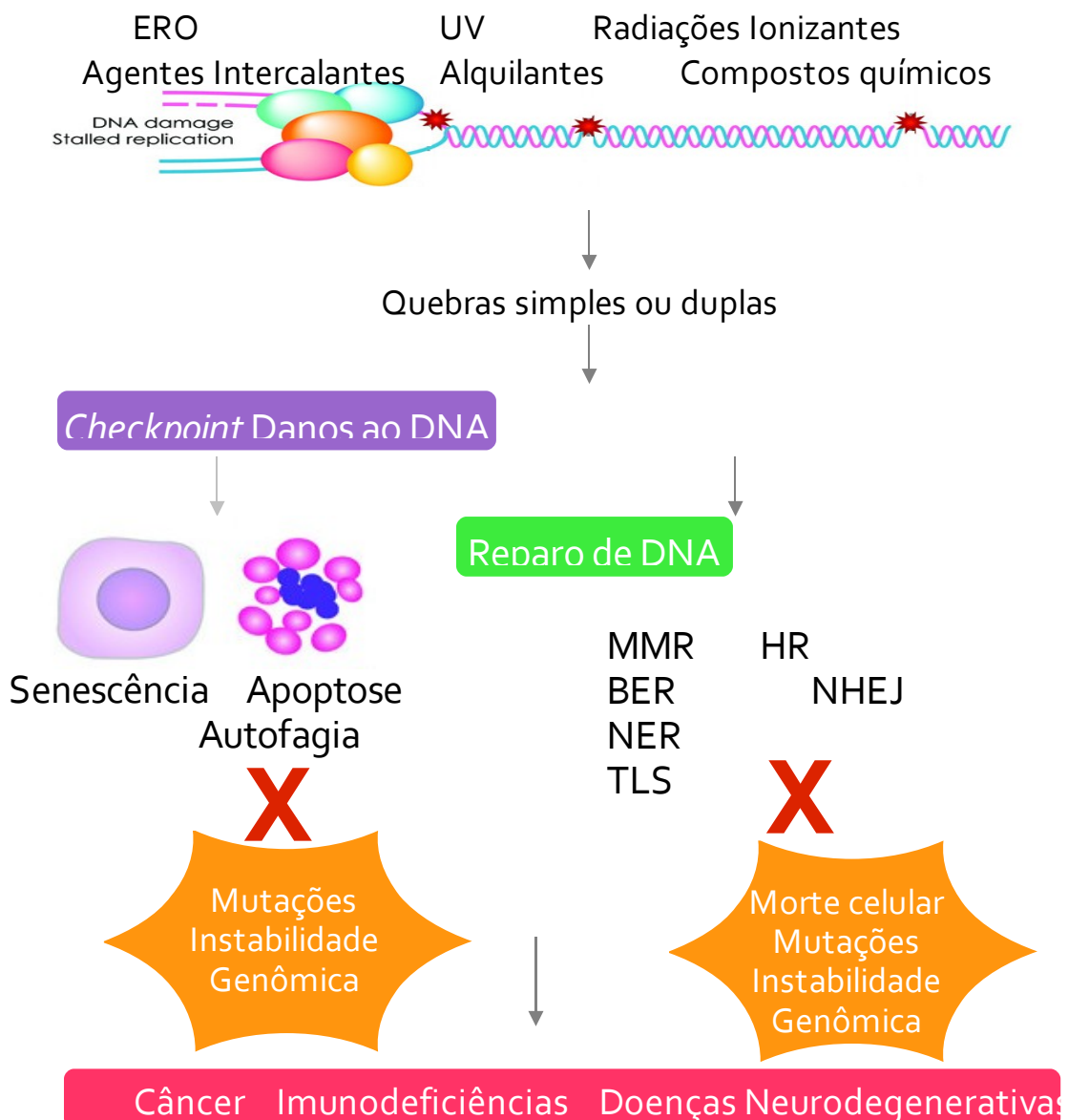


Figura 1. Danos ao DNA, vias de reparo e respostas celulares. Adaptado de BOHGAKI, BOHGAKI e HAKEM, 2010.

2. REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS (NER)

O NER é uma das vias mais versáteis e flexíveis de reparação de DNA, responsável pela reparação de um grande repertório de lesões estruturais não relacionadas entre si (COSTA, 2003; SUGASAWA, 2011). Adutos volumosos no DNA, como fotolesões (6-4 fotoprodutos) e dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD) causados por luz ultravioleta, são reparadas pelo NER. Além destes, pontes intra e intercadeias (*crosslinks*), também são reparadas por esta via (CHRISTMANN et al., 2003). Este sistema atua removendo lesões que levam a distorções da dupla hélice do DNA, interferindo no pareamento de bases e bloqueando a replicação (COSTA, 2003). O processo é realizado através de uma estratégia perspicaz: ao invés de possuir uma coleção de enzimas específicas para reconhecer lesões diferentes, o NER as detecta através das distorções que causam na dupla hélice (NOUSPIKEL, 2009).

Os mecanismos básicos desta via de reparação são conservados evolutivamente, pois processos análogos no reconhecimento da lesão, na incisão do DNA, excisão do fragmento e na ressíntese da fita de DNA são observados entre bactérias, leveduras e mamíferos (ROUILLON e WHITE, 2011).

Diversos estudos bioquímicos e moleculares têm demonstrado que o sistema NER pode ser dividido em duas sub-vias de reparação (Figura 2): o reparo global do genoma (*global genome repair*, GGR), que pode detectar e remover lesões através do genoma e a reparo acoplado a transcrição (*transcription-coupled repair*, TCR), que garante uma reparação mais rápida de lesões localizadas na fita transcrita de genes que estão sendo expressos (GILLET e SCHÄRER, 2006; HANAWALT e SPIVAK, 2008; VERMEULEN e FOUSTERI, 2013).

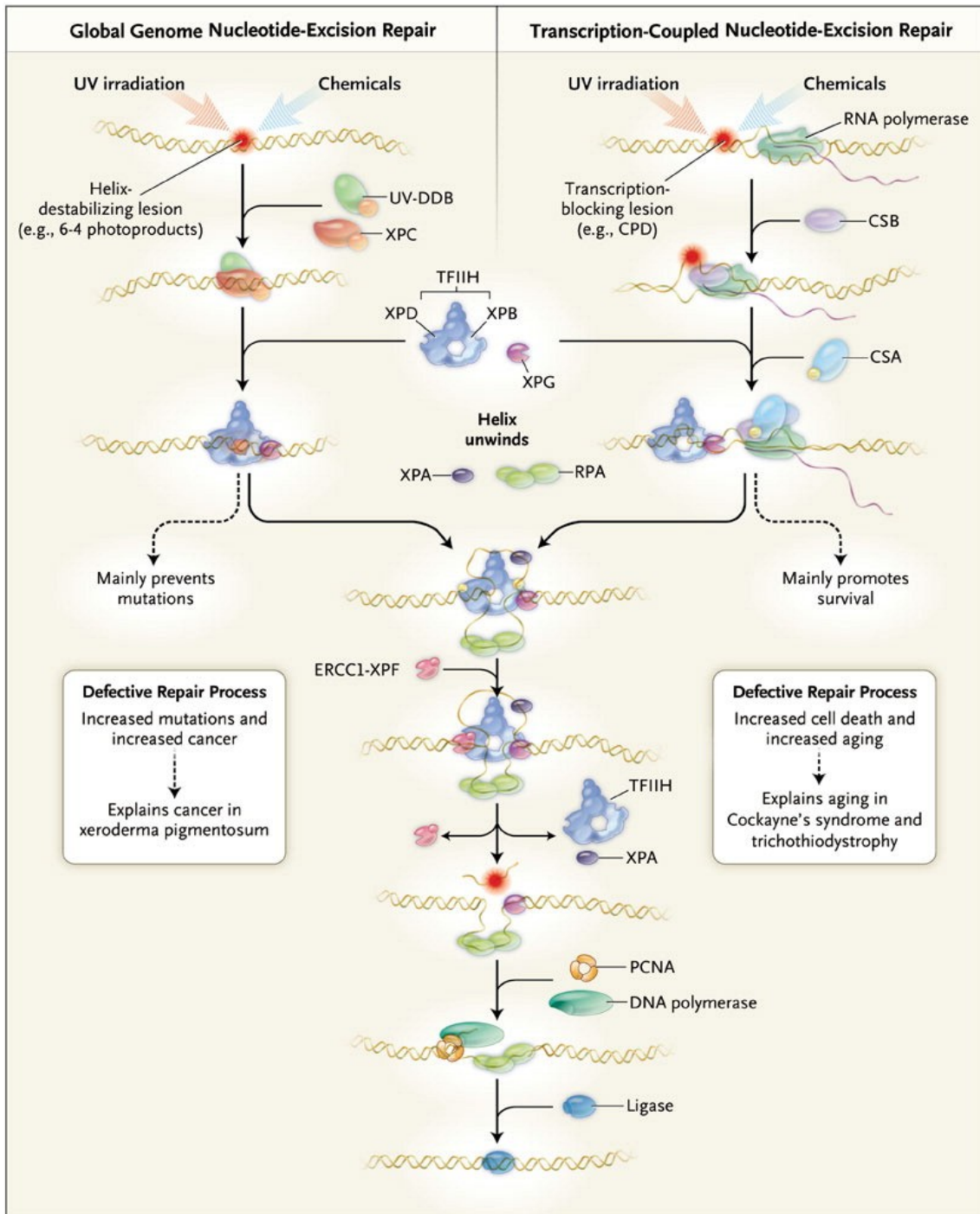


Figura 2. Mecanismos moleculares do NER. (HOEIJMAKERS, 2009).

Nos eucariotos, os dois processos diferem apenas no reconhecimento das lesões. Como pode ser acompanhado na figura 2, o GGR é iniciado pelos complexos protéicos XPC/hHR23B e UV-DDB, envolvidos no reconhecimento da distorção da hélice de DNA e a abertura da fita localmente (GILLET e SCHÄRER, 2006; MIN e PAVLETICH, 2007). Já o

TCR, inicia com o bloqueio físico da RNA polimerase II na lesão da fita que está sendo transcrita e pelo recrutamento dos fatores CS (CSA e CSB), UVSSA, XAB2, e HMG1 (VERMEULEN e FOUSTERI, 2013). Além do recrutamento destes fatores, várias teorias propõem como a polimerase deve deixar ou ser deslocada da região lesionada para permitir o acesso da maquinaria de reparação (MCKAY e CABRITA, 2013). Nos eucariotos, os dois processos diferem apenas no reconhecimento das lesões.

A CSB pertence a família SWI/SNF de modificadores de cromatina, é uma ATPase que possui um domínio helicase sem atividade, envolvida em muitos aspectos do metabolismo do DNA, como reparo e a transcrição (CITTERIO, VERMEULEN e HOEIJMAKERS, 2000; NEWMAN, BAILEY e WEINER, 2006). CSB participa no recrutamento de proteínas adicionais de reparação para a RNA polimerase bloqueada em uma lesão, possivelmente pela sua atividade no remodelamento de cromatina (HANAWALT e SPIVAK, 2008). Além do seu papel no reparo, a proteína CSB também atua na transcrição interagindo e estimulando o alongamento da transcrição pela RNA polimerase II (CHRISTOPHER SELBY e AZIZ SANCAR, 1997; LEBEDEV, SCHARFFETTER-KOCHANNEK e IBEN, 2008). Ela também atua como um fator auxiliar no BER (MUFTUOGLU et al., 2009; WONG et al., 2007). Alguns trabalhos demonstram o envolvimento de CSB no metabolismo mitocondrial, tanto na reparação de lesões oxidativas do DNA mitocondrial (AAMANN et al., 2013; KAMENISCH et al., 2010), quanto promovendo autofagia mitocondrial (mitofagia) a fim de prevenir o acúmulo de mitocôndrias danificadas (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012).

Após o reconhecimento das lesões, ocorre a convergência das duas sub-vias (Figura 2), onde há o recrutamento do fator de transcrição TFIIH, um complexo multiprotéico composto por 10 subunidades divididas em núcleo (XPB, p52, p8, p62, p34, p44), complexo CAK (cinase ativada por ciclina, composta por CDK7, ciclina H, e MAT1) e a proteína XPD, que faz a ligação entre os dois (COMPE e EGLY, 2012).

As proteínas XPB e XPD possuem atividades de ATPase e helicase respectivamente, fazendo a abertura da hélice de DNA no local da lesão (EVANS et al., 1997; TAPIAS et al., 2004). Esta etapa é descrita como o primeiro passo irreversível do NER (GILLET e SCHÄRER, 2006). A proteína XPD também é uma candidata a fator de verificação de lesão, uma vez que foi demonstrado que sua atividade de helicase é bloqueada na presença de lesões de DNA (NAEGELI, BARDWELL e FRIEDBERG, 1992). Alguns estudos estruturais também suportam esta ideia (BUECHNER et al., 2014; PUGH,

WU e SPIES, 2012; WOLSKI et al., 2008).

Com a abertura da dupla-fita, fitas simples são geradas ao redor da lesão facilitando recrutamento de XPA e RPA. Estas proteínas possuem papel de proteger a fita simples de DNA e estabilizar o complexo pré-incisão, sendo que XPA se associa a fita danificada enquanto RPA à fita oposta a lesão (LEE et al., 2003; PARK e CHOI, 2006).

A proteína XPG é recrutada, primeiramente apenas com função estrutural na montagem do complexo de pré incisão, sem atuar cataliticamente (EVANS et al., 1997). O último fator a chegar é o complexo endonucleásico ERCC1-XPF que corta na extremidade 5', e então XPG atua incisando a fita danificada na porção 3' (STARESINCIC et al., 2009). A proteína XPF gera uma região 3' OH livre, que serve como substrato para a maquinaria de replicação iniciar a síntese de reparação. Esta ação coordenada de XPF e XPG pode servir como mecanismo de segurança para que a lacuna formada na dupla incisão não persista, pois XPG gera um grupo 5' P que serve apenas como substrato na etapa de ligação (SCHÄRER, 2013).

O oligonucleotídeo de aproximadamente 30 nucleotídeos, que possui a lesão é então removido com TFIIH associado a ele (KEMP et al., 2012) e a lacuna resultante é preenchida pelas polimerases δ , ϵ ou κ . O recrutamento de Pol δ requer o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) e o fator de replicação C (RFC, *replication factor C*) (Figura 2). Para Pol κ é necessário o PCNA ubiquitinado, e Pol ϵ (sugere-se que Pol ϵ seja importante em células em divisão) necessita de uma forma alternativa de RFC contendo Ctf-18 (LEHMANN, 2011; OGI et al., 2010). Posteriormente, finalizando o processo do NER, as fitas são ligadas pela DNA ligase III e pela DNA ligase I em células replicativas (MOSER et al., 2007).

A importância do NER funcional pode ser ilustrada em três síndromes autossômicas recessivas, raras e distintas: *Xeroderma pigmentosum* (XP), Síndrome de Cockayne (CS) e Tricotiodistrofia (TTD) (Figura 3)(CLEAVER, 2005; HOEIJMAKERS, 2001).



Figura 3 . Pacientes com XP (a), TTD (b) e CS (c).(LEHMANN, 2001).

Xeroderma pigmentosum é uma síndrome autossômica recessiva na qual o paciente apresenta uma severa sensibilidade à luz solar, o que desencadeia uma progressiva degeneração das regiões da pele e dos olhos expostas ao sol. Além disso, um número significativo desses pacientes também apresentam degeneração neurológica progressiva (KRAEMER et al., 2007). No Japão, a frequência é de 1 a cada 10.000, sendo 10 vezes maior que na Europa e nos Estados Unidos (MORIWAKI e KRAEMER, 2001). Estudos genéticos demonstram que mutações nos genes dos sete grupos de complementação XPA-G levam à XP (RAPIN, 2013).

Exposições a luz solar podem resultar em várias formas de malignidade, tendo uma alta incidência de câncer de pele e mucosas, incluindo carcinomas melanomas. A incidência de câncer desses indivíduos aos 20 anos é 2000 vezes maior do que na população em geral (CLEAVER, LAM e REVET, 2009).

A CS é também extremamente rara, ocorrendo em 1 a cada 0,5-1 milhão de indivíduos (MORIWAKI, 2013). Esta síndrome progeroide é caracterizada por fotossensibilidade cutânea e aumentada sensibilidade à luz UV, devido a uma deficiência na via de reparo acoplada à transcrição (TCR) (DIDERICH, ALANAZI e HOEIJMAKERS, 2011). Mutações em dois genes CSA e CSB (ERCC8 e ERCC6) são responsáveis por 10%-20% e 80-90% dos casos de CS, respectivamente. A apresentação clínica de CS é variada, e classificada de acordo com a severidade e o surgimento dos sintomas em 3

tipos: Tipo I (clássico) no qual os pacientes sobrevivem até a puberdade, tipo II (severo)- no qual os pacientes morrem ainda na infância e tipo III (atrasada ou amena)- que acomete indivíduos adultos (RAPIN, 2013).

Estes pacientes apresentam uma série de características morfológicas severas como olhos profundos, orelhas proeminentes, face enrugada, baixa estatura, desenvolvimento sexual arrastado, caquexia e osteoporose. Além destes, destacam-se os sintomas neurológicos como microcefalia, aumento dos reflexos tendíneos, surdez e perda de visão progressivas, ataxia, atraso no desenvolvimento psicomotor e retardo mental (KRAEMER et al., 2007).

Algumas mutações em genes XP (XPB, XPD e XPG) levam ao tipo severo e raro de CS, onde os acometidos manifestam uma combinação de sintomas de XP com CS (XP/CS) (LINDENBAUM et al., 2001) . As degenerações neurológicas presentes em CS estão correlacionadas com uma atividade de alguns componentes do NER em reparar lesões oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial (D'ERRICO et al., 2013; SPIVAK e HANAWALT, 2006).

A TTD tem como principal característica a redução da matriz protéica rica em cisteínas dos cabelos (*sulfur-deficient brittle hair*) (ITIN, SARASIN e PITTELKOW, 2001). Além disso, são características destes pacientes a redução de estatura, o atraso no desenvolvimento, comprometimento mental, anormalidades oculares, e ictiose (pele escamosa) (FAGHRI et al., 2008).

A maioria dos pacientes apresenta sensibilidade à luz solar, devido à deficiência do NER atribuída às mutações em subunidades do TFIIH-XPB, XPB ou p8/TTDA (HASHIMOTO e EGLY, 2009). Embora sejam mutações também encontradas em pacientes XP, não há referência de câncer nesses pacientes nem de anormalidades de pigmentação da pele (LEHMANN, 2001).

Pela alta incidência de câncer nos pacientes XP e pelas anormalidades no desenvolvimento dos pacientes CS e TTD, pode-se observar o importante papel que o GGR-NER tem ao remover lesões no DNA que induzem carcinogênese prevenindo mutações, bem como o papel do TCR-NER removendo lesões que desencadeiam morte celular, prevenindo desta forma o envelhecimento precoce do organismo (DIDERICH, ALANAZI e HOEIJMAKERS, 2011; VERMEULEN e FOUSTERI, 2013).

3. DOXORRUBICINA

A Doxorubicina (DOX), ou também conhecida como Adriamicina, é um antibiótico pertencente a classe de moléculas denominada antraciclina (figura 4). Os primeiros compostos desta classe foram isolados na década de 1960 do pigmento produzido pela bactéria *Streptomyces peucetius* (MINOTTI et al., 2004; YANG et al., 2014).

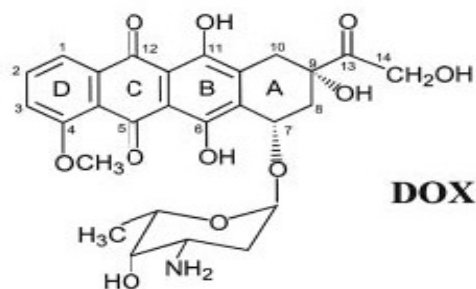


Figura 4. Estrutura química da Doxorubicina. Constituição básica das antraciclina que possuem quatro anéis aromáticos (A, B, C e D) assim como um açúcar ligado a posição 7 do anel A. Adaptado de Minotti e colaboradores (2004).

Por cerca de quarenta anos, a DOX tem sido um dos agentes antineoplásicos mais extensamente empregados na clínica, sendo componente essencial no tratamento de cânceres de mama, tumores sólidos da infância, sarcomas de tecido mole, e linfomas agressivos (CUTTS et al., 2005; MINOTTI et al., 2004).

Apesar da sua grande eficácia, o uso de antraciclina na clínica é limitado devido a sua cardiotoxicidade irreversível e efeitos colaterais. Os mecanismos pelos quais DOX causa cardiotoxicidade ainda não são completamente compreendidos e muitas hipóteses tem sido propostas envolvendo, ao menos em parte, o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose. Recentemente é sugerido um possível papel da autofagia nessa cardiotoxicidade (DIRKS-NAYLOR, 2013; KAWAGUCHI et al., 2012; MINOTTI et al., 2004).

Classicamente, o mecanismo de citotoxicidade predominante da DOX é sua ação como um veneno da enzima topoisomerase II (TopoII), inibindo a sua atividade ao estabilizar a reação intermediária que ocorre durante a transcrição e replicação. Neste processo, as fitas de DNA são clivadas e covalentemente ligadas à topoisomerase II,

formando os chamados complexos cliváveis transientes TopoII(a)-DNA. DOX estabiliza este complexo, formando um complexo ternário (DOX-TopoII(a)-DNA), e impede o religamento do DNA, levando assim a formação de quebras duplas (FORREST et al., 2012; MINOTTI et al., 2004; SPENCER et al., 2008; YANG et al., 2014).

Além de inibir Topo II, o tratamento com esta droga é capaz de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e adutos no DNA, e desestabilizar nucleossomos. A quinona presente na DOX pode ser oxidada a um radical semiquinona, que rapidamente reage com oxigênio gerando peróxido de hidrogênio e superóxido. Além disso, a DOX pode atuar como um quelante de ferro, gerando radicais hidroxil altamente reativos (MINOTTI et al., 2004; YANG et al., 2014).

A DOX pode também atuar pela formação de adutos de DNA; neste caso, a molécula intercala-se preferencialmente em sítios com os pares guanina-citosina(GC) adjacentes, ligando-se covalentemente a uma das fitas de DNA. Fisiologicamente, o formaldeído derivado de reações de radicais livres de carbonos (provenientes de lipídeos), pode ser um componente necessário para a formação destes adutos, formando uma ponte covalente entre a DOX e uma G em uma das fitas mediada pelo formaldeído e uma ponte de hidrogênio entre a DOX e a G da fita oposta. (CUTTTS et al., 2005; FORREST et al., 2012; SPENCER et al., 2008; YANG et al., 2014).

É importante salientar que diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa e colaboradores, demonstraram que linhagens de fibroblastos humanos deficientes em NER são mais sensíveis ao tratamento com esta classe de drogas em relação a linhagens proficientes. Como discutido anteriormente, esta via é responsável por reparar lesões que distorcem a molécula de DNA, tais como os adutos gerados pelas antraciclinas, reforçando o provável papel do NER no reparo deste tipo de dano na citotoxicidade causada pela DOX (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; SAFFI et al., 2010).

Deve-se levar em consideração que, dependendo da concentração e do regime de tratamento empregado desta droga e dos seus múltiplos mecanismos de ação, diferentes cascatas de sinalização são ativadas. Desta forma, o desfecho final do tratamento com DOX pode ser tanto citostático, como citotóxico envolvendo vias antiproliferativas e/ou de morte celular como apoptose, senescência, catástrofe mitótica, e autofagia (DI et al., 2009; EOM et al., 2005).

4. AUTOFAGIA

A autofagia (“self eating” - comer a si próprio) é o termo utilizado para descrever o processo catabólico pelo qual a célula usa a maquinaria lisossômica para digerir seu conteúdo citoplasmático, tais como organelas danificadas, supérfluas e proteínas mal dobradas. É uma via evolutivamente conservada que atua como um sistema dinâmico de reciclagem dentro das células e como controle de qualidade, sendo essencial para a manutenção da homeostase e para orquestrar respostas celulares eficientes ao estresse (CUERVO, 2008)

Desencadeada em processos fisiológicos e/ou patológicos, a autofagia tem papel importante no desenvolvimento, diferenciação, neurodegeneração, infecções, síndromes metabólicas e câncer (RABINOWITZ e WHITE, 2010). O estímulo mais conhecido da autofagia é a escassez de nutrientes na célula, que serve como recurso alternativo de energia, mas além dele diversos outros estímulos são capazes de desencadear o processo autofágico, como por exemplo a hipóxia, infecções bacterianas e virais, estresse oxidativo, e dano ao DNA (BORDIN et al., 2013; SRIDHAR et al., 2012).

Existem três principais formas de autofagia descritas, dentre as principais estão: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Microautofagia refere-se ao englobamento de componentes celulares diretamente pelos lisossomos através da invaginação, protusão e septação da membrana lisossômica. Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas alvo são translocadas através da membrana lisossômica em um complexo com proteínas chaperonas tais como Hsc-70 - proteínas do retículo endoplasmático rugoso que são responsáveis pelo dobramento correto de proteínas. Quando estão associadas são reconhecidas por um receptor de membrana lisossômica, proteína de membrana associada ao lisossomo 2A (LAMP-2A), resultando no desdobramento e degradação. A forma mais compreendida e estudada de autofagia é a macroautofagia, onde os componentes celulares são envolvidos em uma membrana lipídica dupla, denominada autofagossomo, e entregues aos lisossomos para degradação (VELLAI et al., 2009). Neste trabalho, o termo autofagia será utilizado como sinônimo de macroautofagia, exceto quando explicitado.

Inicialmente, ocorre a formação de uma estrutura de membrana dupla denominada fagóforo ou membrana de isolamento, na etapa denominada de iniciação/nucleação, cujo crescimento devido ao englobamento de componentes celulares terminará originando o autofagossomo no passo chamado sequestro. Estes processos são seguidos da

etapa de maturação, onde o autofagossomo poderá se fundir com o lisossomo, formando um autolisossomo ácido. Na qual em um processo de reciclagem, degrada o material até então sequestrado no seu interior por enzimas lisossômicas, devolvendo ao citoplasma os produtos da degradação para reutilização (TOOZE e YOSHIMORI, 2010) (Figura 5).

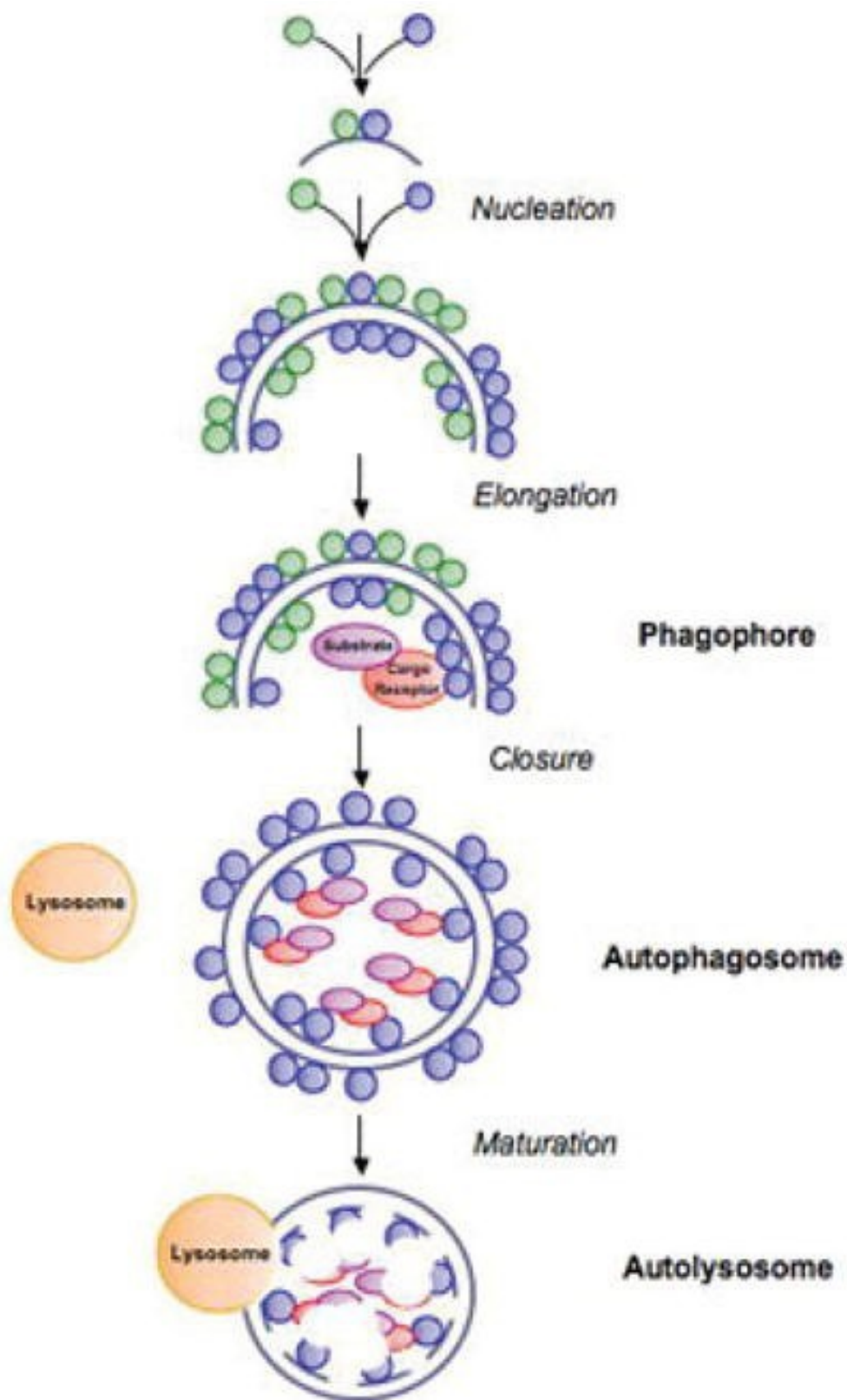


Figura 5. Representação esquemática dos passos de autofagia em células de mamíferos.

(KUNG, BUDINA, BALABURSKI, BERGENSTOCK, & MURPHY, 2011)

4. 1 MECANISMOS MOLECULARES

Autofagia insuficiente pode ser deletéria para a célula, mas os níveis excessivos também podem ser prejudiciais. Assim, a autofagia é um processo rigidamente controlado em todos os eucariontes.

As etapas do processo autofágico são reguladas por uma grande família de genes Atg. Seus produtos, as proteínas relacionadas a autofagia, primeiramente foram descritas em leveduras, chegando hoje a cerca de 35 proteínas que promovem a formação dos primeiros passos do autofagossomo.

Nos mamíferos, pelo menos cinco complexos estão envolvidos neste processo: (1) complexo para iniciação Atg1/(Ulk1); (2) complexo para nucleação Beclina 1/ fosfatidilinositol 3-cinase classe 3 (PI3K III) (3) para o alongamento e “encerramento/fechamento” Atg12 e LC3; (4) proteína transmembrana Atg9 e proteína de membrana do vacuolo 1 (VMP1); e (5) proteínas que mediam o fusão entre o autofagossomo e o lisossomo (KROEMER, MARIÑO e LEVINE, 2010; NAVARRO-YEPES et al., 2014).

Para a formação do fagóforo Atg13 liga-se a Ulk1 (Atg1 em leveduras), ou ao homólogo Ulk 2, mediando a ligação com FIP 200 (ortólogo atg17). Esta etapa é regulada pela cinase sensora de energia mTORC1 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1), que ao fosforilar Atg13 previne sua ligação com Ulk1 (Ulk2). Quando mTOR é inibida ou na privação de nutrientes, mTORC1 dissocia-se do complexo Ulk, desfosforilando Ulk/Atg13 permitindo a desfosforilação de Ulk1 e a fosforilação de Atg13 e FIP200. O complexo Ulk1/2-Atg13-FIP200 será translocado para o local de geração do pré-autofagossomo (ALERS et al., 2012; KUNG et al., 2011; NAVARRO-YEPES et al., 2014).

Na etapa de nucleação, a formação do pré autofagossomo requer o complexo beclina-1 (Beclina1[ortólogo atg6], PI3K III, p150, Atg14L e Ambra 1). Quando ativada alostericamente por beclina 1, PI3K III Vps 34 (proteína de classificação vacuolar/vacuolar protein sorting 34) produz fosfatidilinositol-3-fosfato PI3P, que por sua vez recruta proteínas efetoras para o início da nucleação e formação do autofagossomo como DFCP1 (*double FYVE domain-containing protein 1*) e WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) (NAVARRO-YEPES et al., 2014; RABINOWITZ e WHITE, 2010).

Para a expansão da membrana dos autofagossomos, no processo chamado de alongamento, e posterior fusão do vacúolo autofágico dois sistemas ubiquitina-like são necessários: Atg5-Atg12 e o sistema proteína de cadeia leve-3 associada ao microtúbulo (LC3/ ortólogo Atg8). Na primeira etapa, Atg7 e Atg10 ligam covalentemente Atg12 com Atg5, que irá interagir não covalentemente com Atg16L formando um complexo multiprotéico, que será direcionado por Atg16L até o fagóforo em expansão e dissociado com o autofagossomo formado (NAVARRO-YEPES et al., 2014).

Na segunda reação tipo ubiquina, LC3 é clivada pela protease Atg4 à LC3-I expondo uma glicina na região carboxi-terminal. LC3-I é então conjugada à fosfatidiletanolamida (PE), em uma reação que requer Atg7 e Atg3, gerando a forma lipídica LC3-II. Esta forma recruta lipídios para expandir a membrana do autofagossomo. A forma LC3-II associa-se tanto a membrana interna, quanto externa do autofagossomo e diferente do complexo Atg16L permanece ligado ao autofagossomo maduro até que este fusione-se com lisossomos, desta forma ele é comumente utilizado para monitorar autofagia (KROEMER, MARIÑO e LEVINE, 2010).

O fusionamento do autofagossomo com lisossomos pode ser mediado por proteínas como ESCRT, SNAREs, Rab7, e proteínas Vps de classe C. O processo é finalizado por proteases lisossomais, necessárias para degradação do conteúdo do autofagossomo (LEE, GIORDANO e ZHANG, 2012).

Muitas vezes a autofagia é considerada uma via de degradação em massa, mas o sequestro seletivo de estruturas nos autofagossomos já foi descrito como um mecanismo para remoção de organelas como a mitocôndria (mitofagia), o núcleo (nucleofagia) e o retículo endoplasmático (reticulofagia) em condições específicas de estresse. Além de organelas, vias de degradação de lipídios (macrolipofagia), glicogênio e patógenos (xenofagia), também têm sido descritas (KUNG et al., 2011; REGGIORI et al., 2012).

Para tanto, algumas proteínas servem como adaptadoras para marcar as estruturas para a maquinaria autofágica. A p62/SQSTM1 (sequestroma 1) e NBR1 (vizinho do gene *BRCA1*) interagem com LC3 através do motivo LIR (região de interação com LC3), e reconhecem proteínas ubiquitinadas, marcando-as para degradação autofágica (GLICK, BARTH e MACLEOD, 2010).

5. SENESCÊNCIA

A senescência celular foi descrita por Hayflick na década de 60 como um mecanismo que limita o tempo de vida celular, em que a célula perde irreversivelmente a capacidade de proliferação (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961; HAYFLICK, 1965). A importância fisiológica deste processo se dá na sua contribuição para o envelhecimento, para supressão tumoral e do reparo tecidual normal (RODIER e CAMPISI, 2011).

Células senescentes caracterizam-se morfologicamente por serem maiores e mais achatadas que as demais em cultura, pelo aumento da granularidade citoplasmática, pela aparência vacuolizada e pelo aumento do conteúdo lisossômico, cuja atividade da enzima lisossomal β -galactosidase é utilizada como biomarcador de senescência (DIMRI et al., 1995; HAYFLICK, 1965; KURZ et al., 2000; LEE et al., 2006). Tais características podem ser observadas na figura 6, onde fibroblastos humanos foram tratados com DOX. Estas células são incapazes de progredir através do ciclo celular, mas se mantêm metabolicamente ativas.

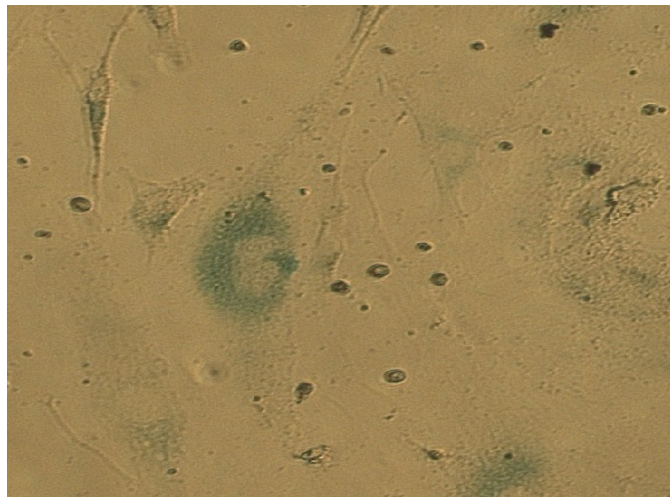


Figura 6. Cultura de MRC5 contendo células senescentes utilizando a técnica de senescência associada à β -galactosidase. Observado no microscópio óptico aumento de 200x. Foto: Larissa Milano.

Além dos citados anteriormente, outras modificações também podem ser observadas no fenótipo senescente, tais como: saída/parada do ciclo celular (KUILMAN et al., 2010) expressão de p16INK4a (SERRANO, 1997; STEIN et al., 1999), focos heterocromáticos associados a senescência (SAHF, *Senescence-associated*

heterochromatin foci) (NARITA et al., 2003) e ainda o fenótipo secretório associado à senescência (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*) (COPPÉ et al., 2008; RODIER et al., 2009).

Senescência é um mecanismo diverso tanto na sua bioquímica, como nos diferentes ambientes e sinais moleculares capazes de desencadeá-la. Desta forma, pode ser dividida em duas principais categorias: senescência replicativa e senescência prematura. A primeira, ocorrendo geralmente quando a célula atinge seu limite de replicação, enquanto a segunda resulta principalmente de danos ao DNA ou sinalização oncogênica. Nesta, diversos subtipos podem ser definidos como a senescência prematura induzida por estresse, senescência induzida por oncogenes, e senescência induzida pela perda de PTEN (VARGAS et al., 2012).

O processo descrito por Hayflick foi a senescência replicativa, a qual é resultado da redução dos telômeros, as estruturas que protegem o final dos cromossomos (HAYFLICK, 1965; KIM SH, KAMINKER e CAMPISI, 2002). Os telômeros, sintetizados pela enzima telomerase, são sequências repetidas (5'-TTAGGG-3') nas extremidades dos cromossomos que a cada replicação perdem parte do seu conteúdo (CHAKHPARONIAN e WELLINGER, 2003; MOYZIS et al., 1988). Como a telomerase não é expressa em todos os tecidos somáticos, a síntese *de novo* dos telômeros a cada replicação é impedida, e as extremidades dos cromossomos acabam desprotegidas (BODNAR, 1998; KIM SH, KAMINKER e CAMPISI, 2002). Isto gera uma sinalização de resposta ao dano no DNA (DDR, *DNA damage response*) persistente, desencadeando uma parada de crescimento (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008; D'ADDA DI FAGAGNA et al., 2003; HERBIG et al., 2004; RODIER et al., 2011). Em alguns modelos celulares, a expressão ectópica da subunidade catalítica da telomerase (hTERT) restaura o comprimento dos telômeros, permitindo o escape da senescência replicativa (MACKENZIE et al., 2000).

Mesmo que a perda de telômeros não seja detectada, células podem entrar em senescência por vias que não envolvem a divisão celular contínua, induzidas por uma variedade de condições como agentes que danificam o DNA e ativação oncogênica.

A senescência induzida por oncogenes (*oncogene-induced senescence*, OIS) é considerada um mecanismo antitumoral endógeno, onde na presença de um estímulo mitogênico excessivo decorrente da ativação de oncogenes as células perdem a capacidade de proliferação independente dos telômeros (CHANDECK e MOOI, 2010; GORGOULIS e HALAZONETIS, 2010; SERRANO, 1997). A expressão de algum

oncogenes como Ras^{G12V}, B-Raf^{V600E} e c-MYC, serve como estímulo para esse processo (CHANDECK e MOOI, 2010; GORGOULIS e HALAZONETIS, 2010; VARGAS et al., 2012).

Esse tipo de senescência já foi descrito em células de tumores benignos, no entanto elas desapareceram completamente na malignização do tumor (COLLADO et al., 2005).

Uma distinta forma de senescência é caracterizada pela perda de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), levando a ativação de Akt e outras proteínas. Diferencia-se da senescência induzida por oncogenes, pois não requer uma resposta hiperreplicativa (VARGAS et al., 2012).

As vias efetoras RB e p53 são importantes para estabelecer e manter a senescência (CAMPISI e D'ADDA DI FAGAGNA, 2007; HERBIG et al., 2004; RODIER et al., 2011). Estas vias regulam a atividade de diferentes componentes do ciclo celular como ciclinas, CDCs e cinases dependente de ciclinas (CDKs, *Cyclin-dependent kinases*), através de uma série de eventos de fosforilação e desfosforilação. Inibidores de CDKs também interagem nestas vias, entre diretamente envolvidos estão p16, p21 e p27 (Figura 7)(VARGAS et al., 2012).

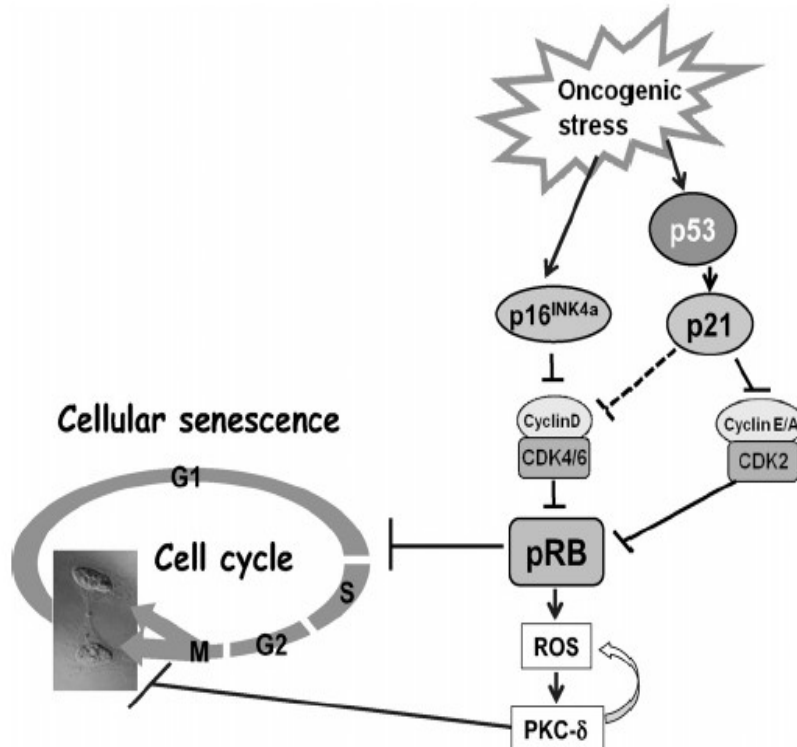


Figura 7. Mecanismos moleculares da senescência celular. (OHTANI, N.; MANN, D. J. & HARA, 2009)

A proteína p16INK4A atua inibindo CDK4 e CDK6, cinases que fosforilam a família de supressores tumorais Rb, que por sua vez regulam negativamente o ciclo celular. Quando fosforilado, Rb é inibida e libera o fator de transcrição E2F permitindo a transição do ciclo G1/S. Já p21, é alvo de p53, e quando ativada irá atuar inibindo CDK 2 para impedir a fosforilação de Rb (OHTANI, MANN e HARA, 2009).

Apesar da grande importância destas vias regulatórias, a senescência pode ser induzida na ausência delas em diferentes tipos celulares (CHANG et al., 2002; EWALD et al., 2008; MICHALOGLOU et al., 2005; OLSEN et al., 2002).

A quimioterapia clássica tem como foco principal a eliminação das células tumorais, levando-as à morte. No entanto, a senescência atua de forma importante impedindo o desenvolvimento tumoral, dado que as células perdem a capacidade de proliferar. Na literatura, trabalhos demonstram que o tratamento em baixas concentrações de DOX em diferentes linhagens, como em neuroblastomas (SARANGI et al., 2012), células de câncer de mama (DI et al., 2009), de hepatomas (EOM et al., 2005), entre outros, estão correlacionadas com a parada de crescimento celular e alterações na proliferação celular com perfil semelhante à senescência.

6. A POSSÍVEL TRANSIÇÃO AUTOFAGIA- SENESCÊNCIA

O primeiro estudo a realmente propor a relação autofagia-senescência foi a publicação de YOUNG e colaboradores (2009). Neste trabalho, por meio de manipulações farmacológicas e genéticas, a interferência na autofagia também suprimiu a senescência, sugerindo que a senescência induzida por oncogenes pode depender de uma ativação de autofagia prévia. O mesmo trabalho conclui que a ausência de autofagia apenas atrasa o fenótipo senescente e que uma vez iniciada, a senescência não depende mais do processo autofágico.

GOEHE e colaboradores (2012) confirmaram o mesmo tipo de resposta para senescência induzida por quimioterápicos (DOX e camptotecina), em linhagens de câncer de mama e de carcinoma de cólon. Neste estudo, os autores sugerem uma possível

sobreposição nas vias de regulação destes dois processos envolvendo formação de espécies reativas de oxigênio, ativação de ATM, indução de TP53 e CDKN1A/p21 e defosforilação de RB.

Em conjunto, os dois artigos demonstram que a autofagia pode acelerar o fenótipo senescente, mas a indução de senescência por estresse não requer obrigatoriamente a autofagia prévia. A suposição é de que a autofagia prévia irá garantir recursos energéticos para um prolongado período de “parada” (GEWIRTZ, 2013).

Autofagia e senescência compartilham algumas características que sugerem que esses processos podem fazer parte do mesmo fenômeno. Ambas apresentam diante do estresse respostas tanto citotóxicas, como citoprotetoras. Dentro dessas características está a possibilidade de indução pelo mesmo tipo de estímulo, como por exemplo, de peróxido de hidrogênio e estresse oxidativo (LUO et al., 2011). Outro aspecto interessante é o aumento de massa lisossômica e a marcação por β -galactosidase, uma enzima lisossômica em células senescentes (KURZ et al., 2000, LEE et al., 2006).

ULK-3, homólogo de ATG1 essencial para a formação inicial do autofagossomo, induziu autofagia em fibroblastos conferindo também aquisição do fenótipo senescente (YOUNG et al., 2009; YOUNG e NARITA, 2010). A catepsina B é uma das proteínas supostas de fazer a ligação entre esses dois processos. Ela é uma protease lisossômica, que sob estresse é liberada no citoplasma e age clivando Sirt1, inativando-a e direcionando o estabelecimento do fenótipo senescente (CHEN et al., 2012).

Estudos recentes demonstram células autofágicas mais sensíveis a indução de senescência (SASAKI et al., 2010, 2012; WHITE e LOWE, 2009). Alguns trabalhos recentes apresentam indução colateral dos dois processos sugerindo que possam estar correlacionados, embora isso ainda não seja um consenso. CAPPARELLI e colaboradores (2012) demonstraram que fibroblastos autofágicos, geneticamente modificados, têm diversas características do fenótipo senescente, como aumento da expressão de p21, hipertrofia celular e níveis elevados de β -galactosidase. Ao avaliar o estroma de alguns tumores relatam autofagia e senescência, promovendo um microambiente tumoral catabólico que poderia proporcionar o crescimento anabólico das células tumorais. Estes autores sugerem que esses processos fazem parte de um processo contínuo.

LUO e colaboradores (2011) encontraram que a autofagia regula a senescência induzida por EROs via p21 e dependente de p38 MAPK α (mitogen-activated protein

kinase α).

No entanto, alguns trabalhos demonstram o oposto, em que a inibição da autofagia facilita a senescência (KANG et al., 2011; WANG et al., 2012). Este fato pode representar uma situação onde a perda da via protetora da autofagia promove a senescência em situações de estresse em células que não são propensas a apoptose (SALAMA et al., 2014). Além disso, estes trabalhos utilizaram condições experimentais diferentes. GOEHE e colaboradores, 2012 e YOUNG e colaboradores, 2009 analisaram a relação entre autofagia e senescência impondo estímulos externos como oncogenes ou quimioterapia, enquanto os trabalhos que não encontraram correlação observaram essa transição na ausência destes, refletindo uma autofagia basal (GEWIRTZ, 2013).

Outra hipótese a ser considerada nessa transição é a resposta à quimioterapia. A autofagia pode ser citoprotetora no estresse induzido pela quimioterapia, mas se o estresse for exacerbado as células podem acabar morrendo por apoptose ou autofagia. Alternativamente, autofagia pode ser sucedida pela senescência. Caso as células tenham adquirido proteção tanto pela autofagia quanto pela senescência, ou ambos, alguns autores (DEMASTERS et al., 2004; ELMORE et al., 2005; JONES et al., 2005; ROBERSON et al., 2005; WANG et al., 2004) suportam o conceito de que ao menos uma subpopulação de células tumorais pode adquirir a habilidade de reiniciar o ciclo celular. Isso poderia caracterizar um processo de dormência tumoral, onde após um período de latência pode haver recorrência da doença (GEWIRTZ, 2009).

Se considerarmos a autofagia como um componente importante no programa senescente, poderíamos especular que a deficiência do processo autofágico atua facilitando a evasão da senescência, contribuindo para o aumento da tumorigenese (LEVINE e KROEMER, 2008; MATHEW, KARANTZA-WADSWORTH e WHITE, 2007). Definir quais aspectos da autofagia são necessários para a senescência, e como isso impacta a supressão tumoral através da senescência, são os próximos questões importantes a serem respondidas (WHITE e LOWE, 2009).

Nenhum dos trabalhos citados anteriormente determinou se autofagia e senescência são processos interdependentes ou relacionados, ou qual a direção desta relação, tornando-se necessários mais estudos nesta área. Sendo ainda, prematuro postular a existência invariável desta relação.

Neste contexto, o presente trabalho é importante por avaliar esta possível transição sob uma condição de estresse em um modelo que patologicamente é deficiente no

processo autofágico. Desta forma, abordando a possibilidade de intrincadas relações entre diferentes vias celulares como o reparo, a autofagia e a senescência.

HIPÓTESE

O TC-NER, ou alguns de seus componentes estão envolvidos na transição autofagia-senescência induzida por DOX.

OBJETIVO

Avaliar a indução de senescência e autofagia pelo tratamento com DOX em linhagens de fibroblastos humanos deficientes em NER.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade em resposta ao tratamento com DOX em linhagens de fibroblastos humanos deficientes no NER (CSB, XPA, XPC e XPD) e da linhagem proficiente no NER (MRC5) ;
- Avaliar a distribuição do ciclo celular das linhagens deficientes e da linhagem proficiente no NER em resposta ao tratamento com DOX;
- Analisar se o tratamento com doses baixas de DOX é capaz de induzir senescência nestas células;
- Determinar o tempo de duplicação da população (*population doubling time*, PDT) nessas linhagens após o tratamento com DOX;
- Avaliar a indução de Apoptose após o tratamento com DOX;;
- Analisar os níveis de expressão das proteínas p21 e p16 após o tratamento com DOX;
- Avaliar a indução de Autofagia após o tratamento com DOX e em conjunto com rapamicina.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos durante o mestrado foram agrupados em um artigo, a ser submetido. O artigo intitulado “CSB and XPD are required for autophagy and senescence induced by doxorubicin” será submetido à *DNA Repair* no formato de *research article*. Minha participação foi tanto da escrita do artigo, quanto na execução de todos os experimentos.

**CSB and XPD are required for autophagy and senescence induced
by doxorubicin**

Larissa Milano de Souza ¹, Temenouga Nikolova Guecheva ¹ Guido Lenz ¹ and Jenifer Saffi ^{2*}

¹Department of Biophysics and Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

²Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: Professor Jenifer Saffi
Rua Sarmento Leite, 245, 029
zip code 90050-170. Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55 51 3303 8803; fax: +55 51 3303 8810.
E-mail address: jenifers@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an important agent in cancer therapy and its mechanism of action includes topoisomerase II-poisoning, free radicals release and DNA adducts formation. The nucleotide excision repair (NER) participates in the removal of lesions that distort the double helix of DNA induced by UV and chemicals. Cell lines deficient in NER are more sensitive to anthracyclines, however little is known about the cellular processes that permit cell survival after treatment with these drugs. In this work we verified the cellular response to DOX induced lesions in human fibroblast cell lines proficient (MRC5) and deficient in NER (CSB, XPA, and XPD) after 72h DOX treatment. The results indicate that cell lines deficient in NER are more sensitive to DOX and die in a dose dependent manner mainly by apoptosis. A proficient MRC5 and XPA deficient cell lines showed a higher percentage of cells in G2/M phase, an increased number of hours required for doubling, increase in senescence markers and in acridine orange staining, indicating autophagy process induction after DOX treatment, while CSB and XPD do not present none of these characteristics. An important clue comes from recent studies linking autophagy with the onset of senescence. Thus, autophagy and senescence may be part of the same physiological process, known as the autophagy-senescence transition. Taken together, our findings suggest that autophagy and senescence tend to occur in parallel, and that autophagy may be required for the senescent phenotype. Furthermore, we can infer that efficient NER following treatment with DOX seems to be essential for cell survival. On the other hand, recruitment of NER pathway factors seems to be necessary for induction of specific cellular responses such as autophagy and senescence.

Keywords: nucleotide excision repair, doxorubicin, senescence, autophagy.

1. Introduction

Nucleotide excision repair (NER) is one of the most versatile DNA repair pathways, removing helix-distorting lesions, such as ultraviolet (UV) light-induced photoproducts, and chemical adducts generated by exposure to genotoxic agents (CHRISTMANN et al., 2003; COSTA, 2003). NER works in two sub-pathways that differ only in the DNA damage recognition either by repairing the genome as a whole (global-genome repair—GGR) or by specifically acting on the transcribed strand of active genes (transcription-coupled repair—TCR)(COSTA, 2003). In TCR damage recognition is done by the blockage of RNA polymerase II and recruitment of proteins CSA and CSB, while in GGR is by the DNA damage is recognized by XPC-hHR23B and DDB1/ DDB2. After DNA damage recognition the helicases XPB and XPD associate with the general transcription factor IIH (TFIIH) complex, sequentially opening the double helix, and the endonucleases XPG and ERCC1-XPF cleaves the damaged strand a few bases away from the lesion. The proteins XPA and RPA are also important for the efficacy of this repair process checking for the presence of damage and stabilizing the open strand, which is followed by the removal of the DNA segment containing the lesion, and the subsequent resynthesis of this strand, using the intact one as template (COSTA, 2003; VERMEULEN & FOUSTERI, 2013).

The biological importance of the NER, is highlighted by severe clinical consequences associated with a hereditary defect in NER. Mutations in XP proteins are found in xeroderma pigmentosum (XP), a rare disease characterized by photosensitivity and a high incidence of skin cancer, besides being sometimes associated with premature aging and neurological symptoms. CS proteins are mutated in Cockayne's syndrome, which is characterized by growth and mental retardation, retinal abnormalities and severe photosensitivity . Mutations in XP genes can also result in trichothiodystrophy (TTD), a disease characterized by brittle hair and nails due to a deficiency in sulfur-rich protein synthesis (MORIWAKI, 2013; RAPIN, 2013)

Besides the involvement in NER, some proteins of this pathway are involved in a variety of cellular processes. For example, CSB acts as an mtDNA damage sensor, inducing mitochondrial autophagy in response to stress and to control the oxidative stress response (D'ERRICO et al., 2013; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012) whereas XPD regulates transcription as part of the general transcription factor IIH (TFIIH) and controls cell cycle progression through its interaction with CAK, a pivotal activator of cyclin dependent kinases (CDKs)(CAMERONI, STETTLER & SUTER, 2010).

Cells derived from XP patients and defective in the proteins XPA, XPC (CARVALHO et al., 2010) and XPD (SAFFI et al., 2010) are more sensitive to the treatment with Doxorubicin (DOX), suggesting a role of these proteins in the repair of DOX-induced lesions. DOX is one of the most studied chemotherapeutic drugs, a member of the anthracycline group, isolated from *Streptomyces peucetius*. The most well characterized mechanism of DOX action is through the inhibition of the enzyme topoisomerase-II (topo-II), with the subsequent formation of double-strand breaks (DSBs) in DNA. However, several other mechanisms are also thought to play a role in DOX induced cytotoxicity, such as DNA adduct formation, DNA cross-linking and free radicals formation (MINOTTI et al., 2004). Previous studies have demonstrated that DOX can induce both autophagy and senescence in tumor cells (CHANG et al., 1999; ELMORE et al., 2005; GOEHE et al., 2012; QIAN e YANG, 2009; ZHANG et al., 2011). Although conceptually considered to be two distinct cellular events autophagy and senescence generally share a number of common characteristics, activated in response to genotoxic stress (GEWIRTZ, 2013; GOEHE et al., 2012). In the last few years, some evidence suggest that the two processes are functionally intertwined and a possible autophagy-senescence transition can exists CAPPARELLI et al., 2012; CHEN et al., 2014; LUO et al., 2011; SASAKI et al., 2012; YOUNG et al., 2009). A number of papers have reported that autophagy can be considered as an effector mechanism of senescence or mediates the process of cellular senescence (SASAKI et al., 2012; YOUNG et al., 2009). Furthermore, the occurring of the two processes in parallel reflects their collateral regulation via common signaling pathways. However, there is still no consensus whether these responses are inexorably linked, interdependent, or just are closely related. On the other hand, the autophagy appears to delay but does not abrogate the senescence phenotype. Thus, potential relationship between autophagy and senescence remains poorly defined.

Autophagy, senescence and DNA repair can be considered a cytoprotective response to stress, reflecting the efforts to evade direct cell killing and tumor resistance (DIDERICH, ALANAZI e HOEIJMAKERS, 2011; GEWIRTZ, 2009; LEVINE e KROEMER, 2008). In this sense, the absence of autophagy induction in CSB cells, and the involvement of NER in repair of lesions induced by anthracyclines, led us to investigate the role of this pathway in the response to DOX treatment by induction of autophagy and senescence. In order to better understand the involvement of CSB, XPA and XPD-NER proteins in the repair of DOX-induced lesions and in autophagy-senescence transition,

human cells defective in these proteins were treated with DOX where upon their responses to the drug were analyzed .

2. Materials and methods

2.1 Cell culture (cell lines and reagents)

Cells used in this work were SV40-transformed fibroblasts isolated from skin biopsies of patients with, CS-B (ASCN1), XP-A (XP12RO), and XP-D (XP6BE) phenotypes. SV40-transformed MRC5 human fibroblasts, proficient for NER DNA-repair, were used as controls. Cells were routinely grown at 37°C, in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL), 1% penicillin and streptomycin (Gibco BRL) and 0.1% fungizone (Gibco BRL). These cells were kindly provided by Dr. Alain Sarasin (IRC, Villejuif, France).

Rapamycin was obtained from LC Laboratories and dissolved in DMSO as 2 mM solution and was used at final concentration of 100 nM, unless otherwise indicated. Doxorubicin (DOX), was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). DOX was dissolved in ethanol, as a 0.4 mg/mL stock solution.

2.2 Cell viability

For cytotoxicity assay, cells were seeded into 24-well plates at concentration of 10⁴ cells per well in complete medium and grown for 24h prior to treatment. The cultures were treated with different concentrations of DOX for 72h. After each treatment, cell viability was assessed using a standard MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay. This involved adding 100 µL of 2 µg/mL MTT per well, incubating in the dark for 3h at 37°C, carefully removing the MTT, and then adding 1 mL DMSO per well. Absorbance was measured at 540nm with a microplate reader (EnSpire Multimode Plate Readers - PerkinElmer Inc.). All values are average of three independent experiments, each done in triplicate.

2.3 Senescence Associated to β -Galactosidase (SA- β -GAL)

Senescence-associated (SA) beta-galactosidase (SA- β -GAL) histochemical staining in the XP, CS and MRC5 cells was performed as described previously (DIMRI et al., 1995).

Cells were exposed for 72h to DOX, after that incubated for seven days in drug-free medium, washed twice with PBS and fixed with 2% formaldehyde for 15 min. Then the cells were washed again with PBS and stained with a solution of 1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM acid citric / sodium phosphate, pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride and 2 mM magnesium chloride. Following overnight incubation at 37°C the cells were washed twice with PBS and 500 μ l of a staining solution was added (containing 0.1 % Triton X-100, 300 mM DAPI and 1 X PBS) for 15 min. After that, photos were obtained using inverted fluorescence microscope Carl Zeiss and the images were analyzed using the ImageJ software. The percentage of stained cells was determined after counting three random fields with 100 cells each.

2.4 Quantification of acidic vacuolar organelles (AVOs) by Acridine Orange staining (AO)

AO is a marker of AVOs that fluoresces green in the whole cell except in acidic compartments (mainly late autophagosomes) where it fluoresces red. Development of AVOs is a typical feature of autophagy, and their formation indicates the maturation of autophagosomes and an efficient autophagic process, since only mature/late autophagosomes are acidic. Cells were plated at 2×10^4 cells per well in a 24-well plate, followed by treatments with DOX and rapamycin for the indicated times. After this, cells were incubated with AO (2.7 mM) for 15 min at room temperature. To quantify the percentage of cells with AVOs (red marked cells), treated cells are removed from the plate and analyzed by flow cytometry using a GUAVA flow cytometer and GUAVA Cytosoft (Millipore, Billerica, MA).

2.5 Annexin-V staining

Phosphatidylserine externalization was determined by annexin fluorescent signal of Annexin-V. Apoptosis induction was quantified by ApoDETECT Kit Assay (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated at 5×10^4 cells per well in a 24-wells plate, followed by treatments as indicated. After this, cells were harvested and incubated with a solution containing PI and Annexin for 30 min, as indicated by the manufacturer, followed by flow cytometry using a GUAVA flow cytometer and GUAVA Cytosoft (Millipore, Billerica, MA). Necrotic cells were identified by

double PI and annexin fluorescent staining, while apoptotic cells were positive only for annexin.

2.6 Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, cells were plated at 2×10^4 cells per well in a 24-well plate, followed by treatments as indicated. After treatments, cells were harvested/ trypsinized and fixed in cold ethanol 70% v/v in phosphate-buffered saline (PBS) for at least 2 h at -20 C. Staining was performed at room temperature for 30 min in filtered PBS containing 6 mM PI, 1 mM EDTA, 0.1% Triton-X-100 and 1 mg/mL RNase A. DNA content was analyzed through flow cytometer.

2.7 Population Doubling Time (PDT)

Cells were plated at each passage in 24-well plates at a density of 50,000 cells/well and exposed to different concentrations of DOX for 72h and re-plated at 1×10^4 per well in duplicate. After 7 days in drug- free medium cells were harvested, and population doublings (PD) were determined according to the formula $PD = [\log N(t) * \log N(t_0)] / \log 2$, where $N(t)$ is the number of cells per well at time of passage, and $N(t_0)$ is the number of cells seeded at the previous passage. The sum of PDs was then plotted against time of culture.

2.8 Protein isolation and Western blotting

Cells were lysed for 5 min on ice in M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) supplemented with protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 mM leupeptin, 1mM aprotinin and 250 mg/mL sodium vanadate) and centrifuged at 11000 g for 5 min to remove cell debris. The amount of protein was determined by the BCA method using bovine serum albumine. 40 mg of protein were separated on a 12 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The membrane was blocked in 5% skimmed milk/TBST for an hour. The following primary antibodies were used: p21 (1:500), p16(1:1000), overnight at room temperature. Primary antibody was detected by incubating with appropriate horseradish peroxidase (HRP) conjugated-secondary antibody (1:2000; Cell Signaling) for 2 h, using ECL and X-ray films. Optical density of the bands was obtained using Bio-Rad software (Quantity One; Hercules, CA).

2.9 Statistical analysis

Results represent the mean of two or three independent experiments, each done in triplicate, with error bars showing the standard error. Experimental differences were tested for significance using Two-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni post-testing (Prism 5 – GraphPad Software Inc., California, USA).

3. Results

3.1 DOX- induced cytotoxicity

To evaluate the DOX-induced cytotoxicity in cells proficient (MRC5) and deficient (XPA, XPC, XPD and CSB) in NER, cell viability and cell death induced by this chemotherapeutic drug were determined. All four NER-deficient strains showed higher sensitivity in MTT assay after 72h of treatment with different doses of DOX in relation to the wild type (Fig. 1). DOX concentration that resulted in 50% cell killing ranged from 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for XP cells, and to 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CS cells.

To assess the contribution of apoptosis to the loss of viability following DOX exposure, cell cultures were exposed to different doses of drug and incubated for 72h. At each time point, the floating and adherent cells were combined and evaluated for apoptosis by flow cytometric determination of Annexin V-positive. In accordance with previously demonstrated (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; SAFFI et al., 2010), cells deficient in NER died mainly by apoptosis in dose and time dependent manner (Fig. 2). Approximately 50% of apoptotic cells was observed in MRC5 after exposure to a high dose of DOX (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72h of treatment. But as noted in the MTT assay, the NER deficient cells were more sensitive to treatment with DOX, already showing such percentage of apoptosis in a dose of 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, it is inferred that the active involvement of NER proteins in the efficient repair of lesions caused by clinical doses of DOX is essential for cell survival.

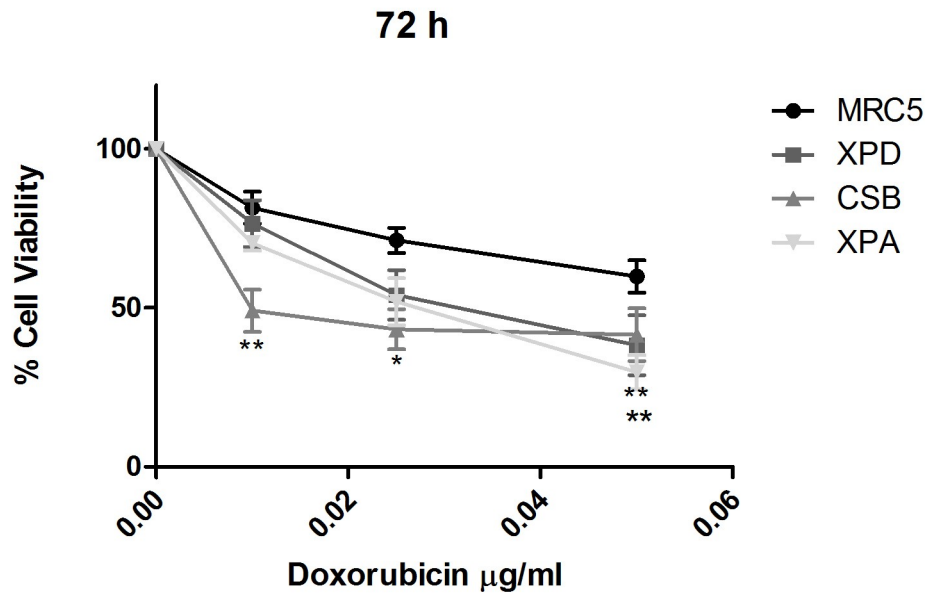


Figure 1. DNA repair deficient and proficient cell sensitivity to DOX. Cells were exposed to the indicated doses of DOX for 72h and cell viability assessed by MTT assay. Statistical analysis was applied for comparing DNA repair proficient (MRC5) with DNA repair deficient (CSB, XPA, and XPD) cells. Results are expressed as percentage of control growth for each data point and represent the mean (\pm standard error) of three independent experiments.

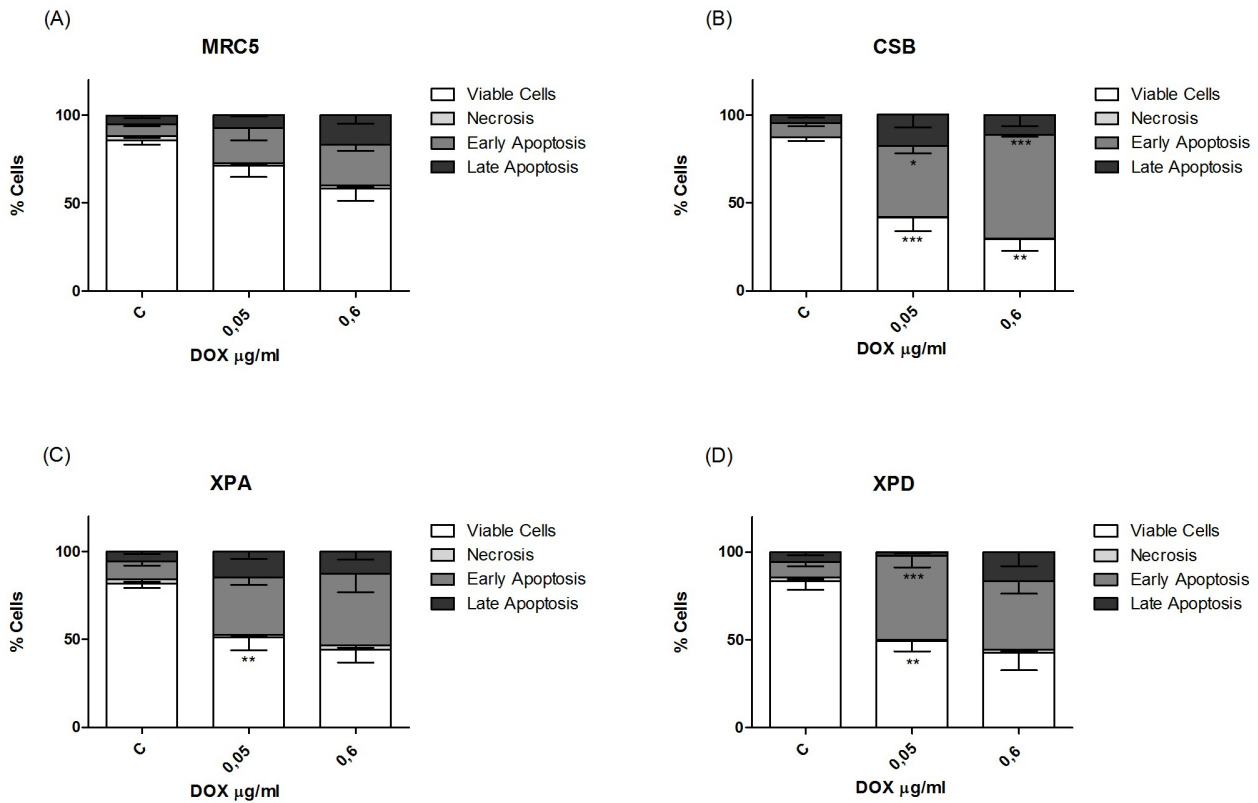


Figure 2. Annexin V - FITC by flow cytometry. After 72 h of treatment with DOX cells are incubated with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. C: Negative control.

3.2 Senescence induction

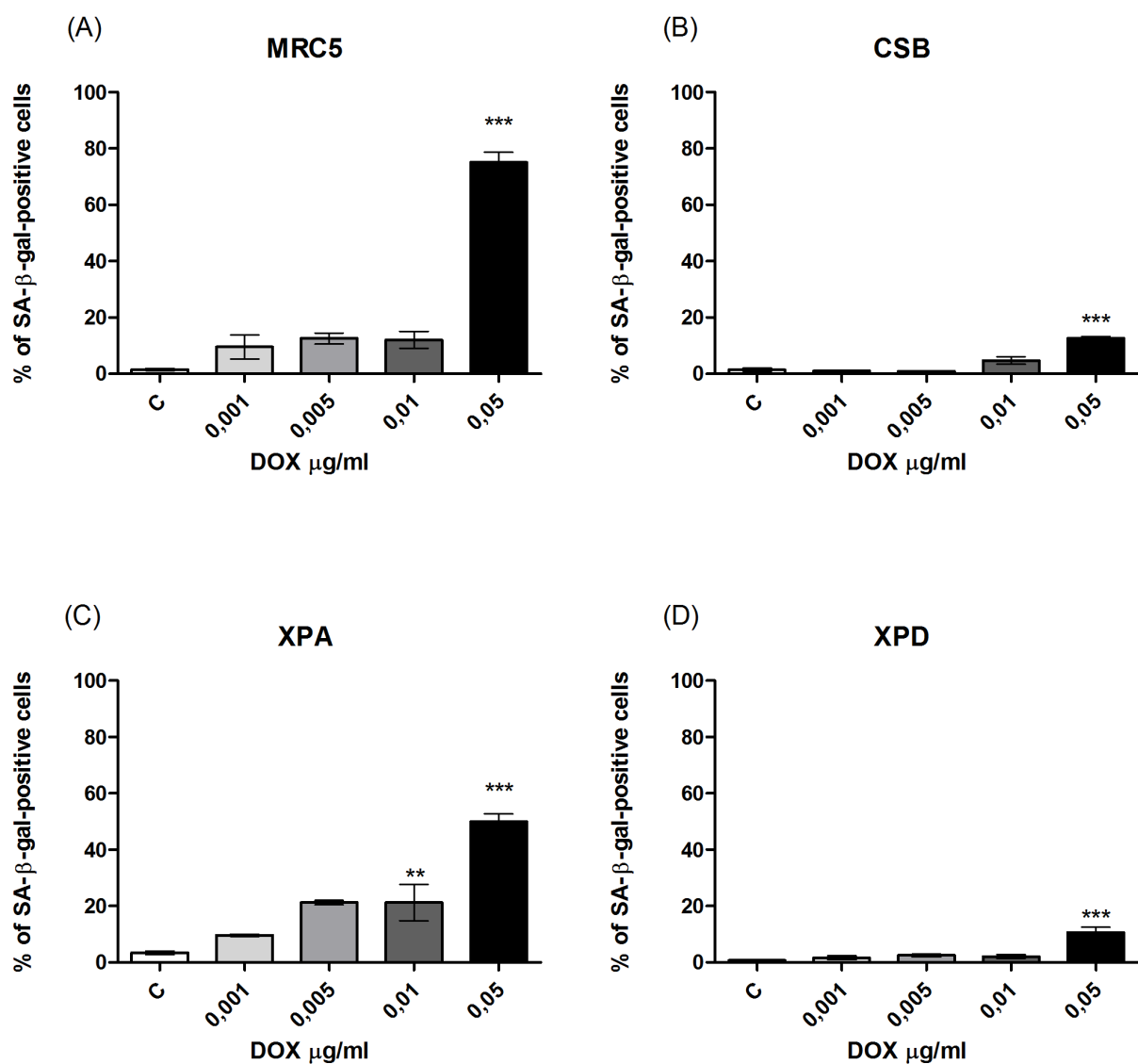
Senescent cell morphology is typically associated with increased nucleus to cytoplasm ratio, enlarged, flat and vacuolated cells and with increased SA- β -gal staining (DIMRI et al., 1995; KURZ et al., 2000). Considering the high sensitivity of NER-deficient cells to doxorubicin, we next determined whether exposure to relatively low doses of DOX (0.001 μ g/mL - 0.05 μ g/mL) can trigger accelerated senescence by SA- β -gal activity. To this end, cells were treated for 72h with DOX and incubated in drug-free medium for 7days. Low doses of DOX increased the SA- β -gal-positive cells to 75% and 50% in MRC5 and XPA, respectively (Figure 3A and 3C). However, the extent of SA- β -gal induction was significantly lower (< 20%) in XPD and in CSB cells (Figures 3B and 3D).

CDK inhibitors play a major role in deciding the fate of cells under stress conditions.

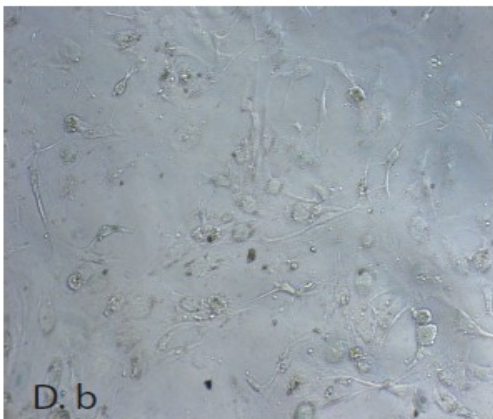
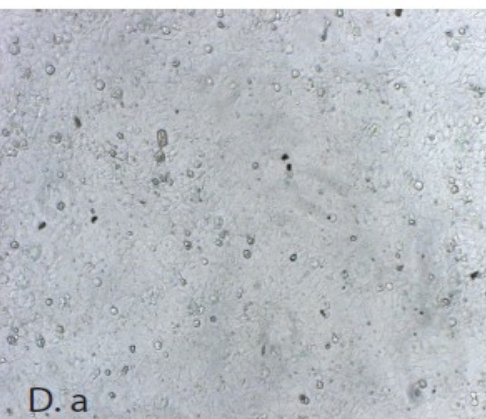
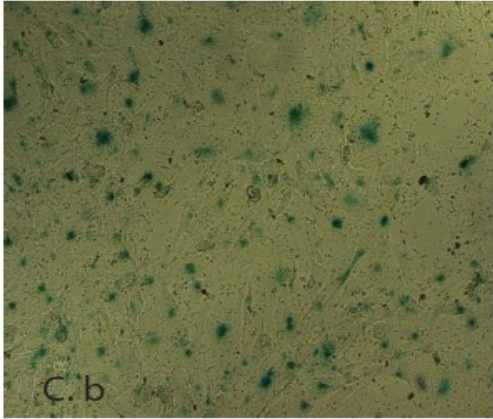
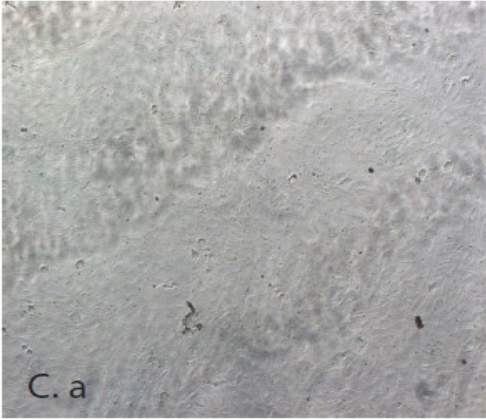
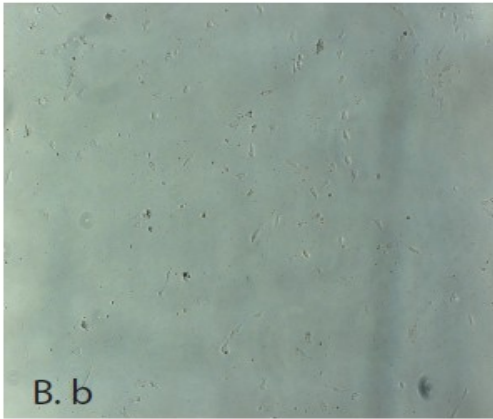
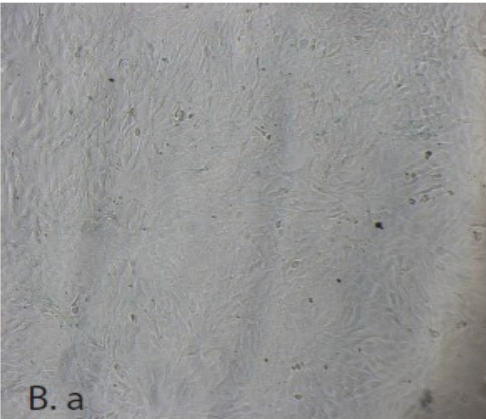
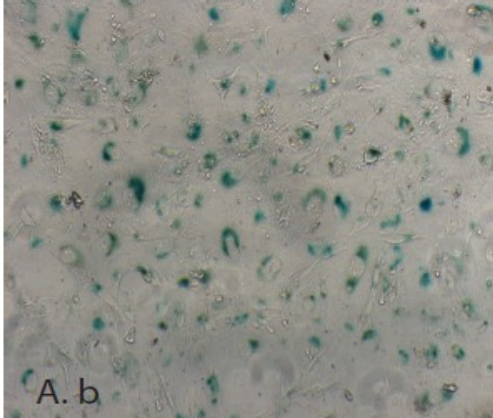
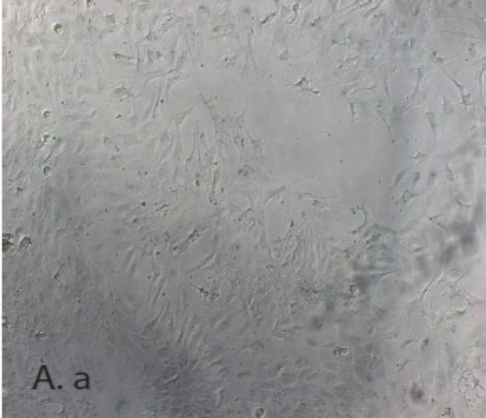
To investigate their functional role in senescence, the levels of p21^{CIP/WAF-1} and p16^{INK4a} were examined by Western Blot after 72h DOX exposure. Likewise, DOX treatment resulted in increased of p16 and p21 levels in MRC5 and XPA cells, confirming the senescent phenotype of these cells. On the other hand, these senescence markers were not affected in CSB and XPD cells in response to DOX treatment (Figure 3F).

Based on these observations, we can consider an involvement of NER in the senescence phenotype induction or maintenance. The CSB and XPD proteins are not just involved in NER pathway, but having interactions and functions in other cellular processes, which broadens the possible role of these proteins in senescence.

Figure 3.



3 (E)



3 (F)

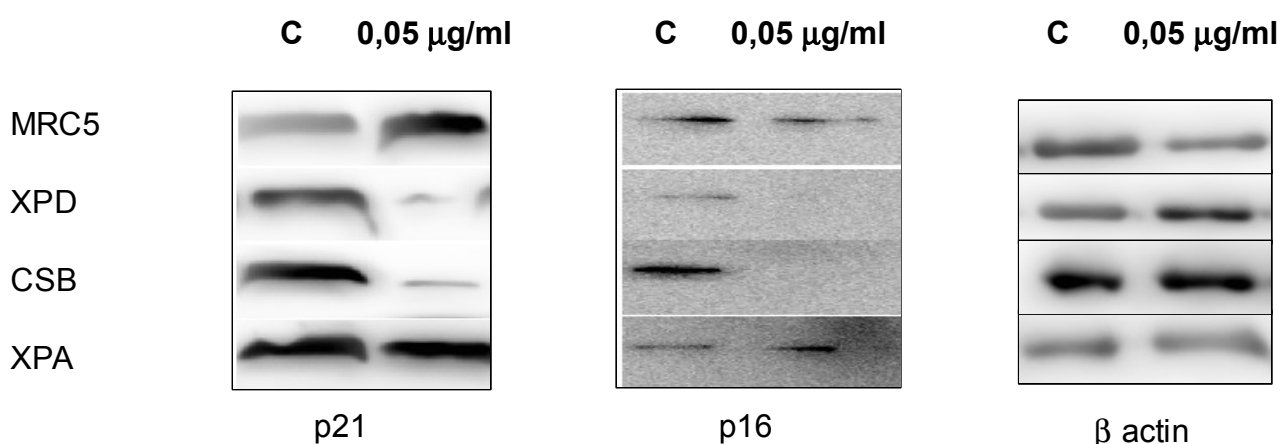


Figure 3. Induction of senescence in DNA deficient cells by DOX. Cells were treated with indicated doses of DOX for 72h, followed by two washes for drug removal. Then cells were growth for 7days in drug-free DMEM and analyzed by SA-beta-gal assay (3A) MRC5, (3B) CSB, (3C) XPA, (3D) XPD . (3E)Representative image (40x). A-MRC5, B - CSB, C - XPA, D - XPD, a – Negative control, b – 0,05 µg/mL DOX.(3F) Cells were treated with DOX for 72h, followed by western blotting using the indicated antibodies. Blotting with β -actin is show as a control for equal protein loading.

3.3 Influence of DOX on cell cycle

Another feature of cells undergoing accelerated senescence is their cell cycle arrest after genotoxic insult. In several cell lines, DOX-treatment leads to cell cycle arrest, mainly in the G2/M phases (BERNT et al., 2002; GRAAT et al., 2006; MORAES et al., 2012, SAFFI et al., 2010). Therefore, we examined the effects of DOX treatment on cell cycle distribution and population doubling time. As expected, DOX induced a G2/M cell cycle arrest in MRC5 and XPA cells at 0.05 µg/mL for 72h, whereas XPD cells in contrast did not have this arrest as can be observed in quantitative data (Fig. 4). When cells were treated with higher doses of DOX (0.2 µg/mL) during 72h, we observed induction of a strong G2 arrest in MRC5 cells, while in XPD cells there was a high increase in sub-G1 population (more than 70% - data not shown).

Consistent with these observations, in PDT assay XPA and XPC deficient cells and

NER proficient MRC5 require more time to double when treated with DOX, revealing that DOX elicited antiproliferative effects at low doses. However CSB and XPD cell lines did not show a relevant change in time required for cell duplication in this conditions (Fig. 5). This indicates that these cells proceed through the cell cycle even after DNA lesions caused by DOX.

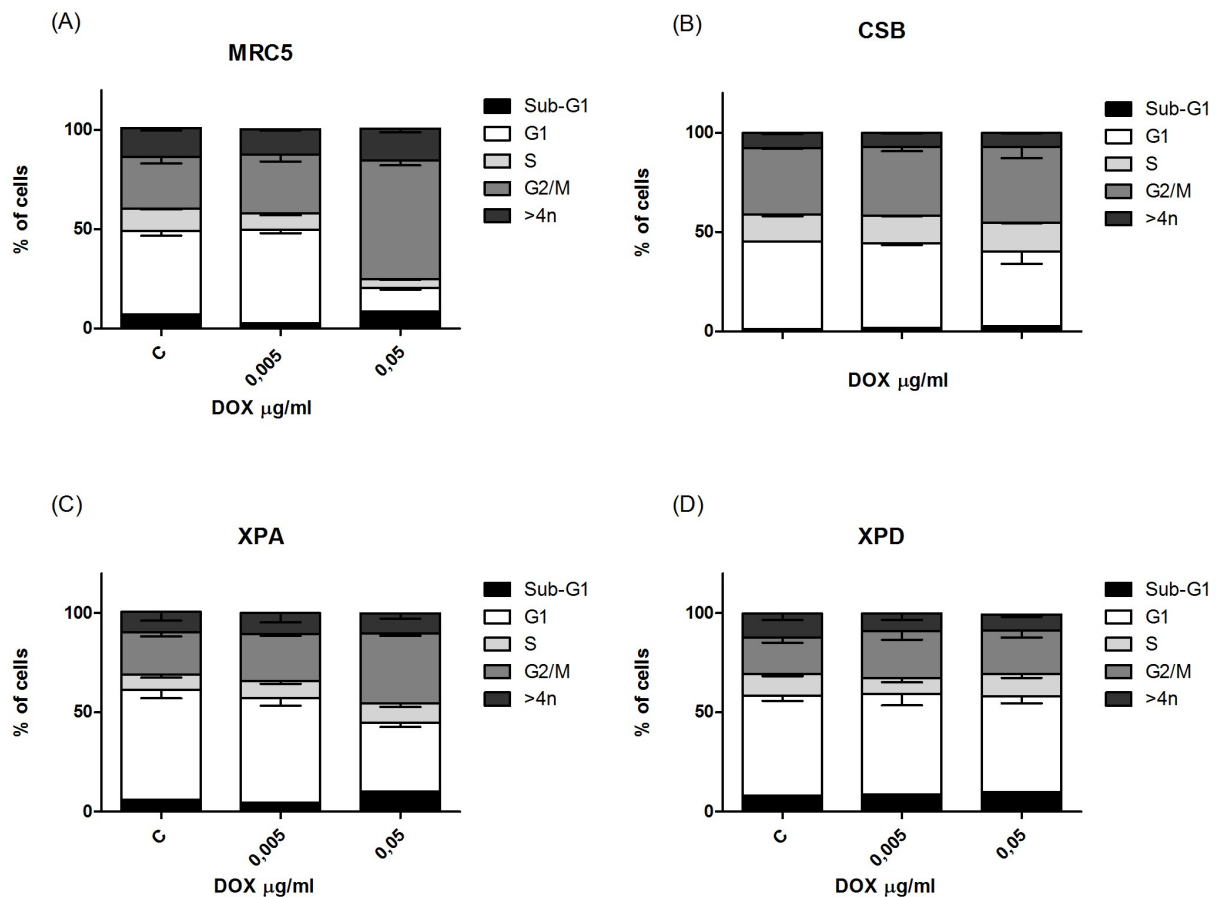


Figure 4. Cell cycle analysis after DOX treatment. CSB, XPA, XPD and MRC5 cells were treated with indicated doses of DOX and analyzed for cell cycle distribution after 72h. Each value represents the mean (\pm standard error) of three individual experiments. *Significantly different in relation to the MRC5 cells at the same concentration, $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

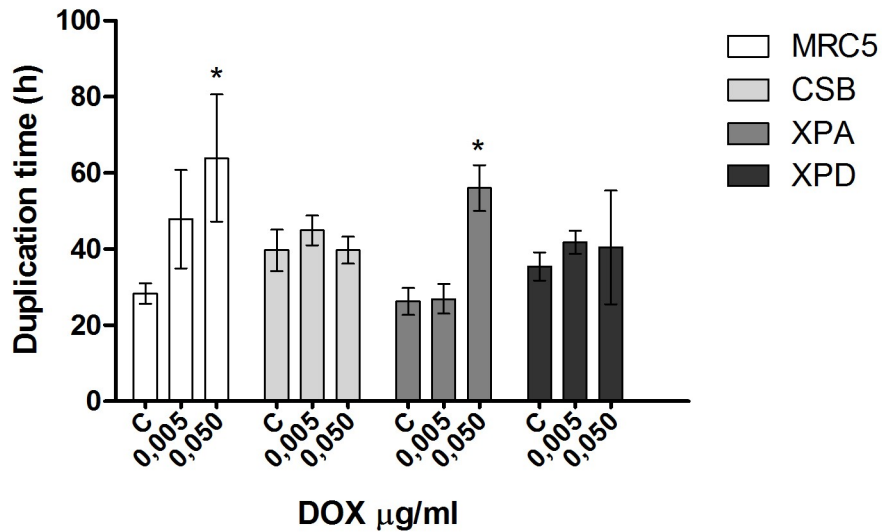


Figure 5. Population doubling time (PDT). Cells are treated for 72h, re-plated and cultured for 7 days in drug-free medium , after cells are counted. The doubling time is given by formula: $PD = \log N(t) \times \text{Log}(N(t_0)) / \text{Log} 2$.

3.4 AVOs formation and autophagy induction

It has been suggested collateral induction and possible interdependence between autophagy and senescence, since different studies have demonstrated that absence of autophagic process can delay or even reduce the senescent phenotype (GEWIRTZ, 2013; GOEHE et al., 2012; YOUNG et al., 2009). In this context, our data demonstrated that XPD and CSB cells did not show a significant senescence induction. Furthermore,

SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012 reported that CSB is required for mitochondrial autophagic process during stress. In order to investigate the possible correlation between CSB and XPD-NER proteins and the possible transition between autophagy and senescence, we evaluated the autophagosomes formation by AO staining. AVOs quantification by flow cytometry analysis demonstrated that DOX increased autophagic vesicle content (from 5.1 to 87.4% and 2.9 to 38.8%, respectively) after 72h of drug exposure in close parallel with the promotion of senescence in MRC5 and XPA cells (Fig. 6A and 6C).

These initial observations suggested that autophagy and senescence might be

collaterally induced responses upon exposure to DOX. However, in CSB and XPD cells we observed no significant increase in the proportion of cells with red staining (Fig. 6B and 6D).

In addition, we observed autophagy induction in 24h of DOX treatment and co-treatment with rapamycin. Significant autophagy was detected just in MRC5 cell, after 24h DOX treatment. Rapamycin, is known to induce autophagy in cells, in order to assess if rapamycin is capable to recover autophagy in CSB and XPD cells, we treated cells with 100nM of this drug or in co-treatment with DOX at the indicated times. Rapamycin was able to induce autophagy at 24 and 72h in MRC5 cells, but in NER- deficient cells only co-treatment with DOX had a relevant autophagy induction.

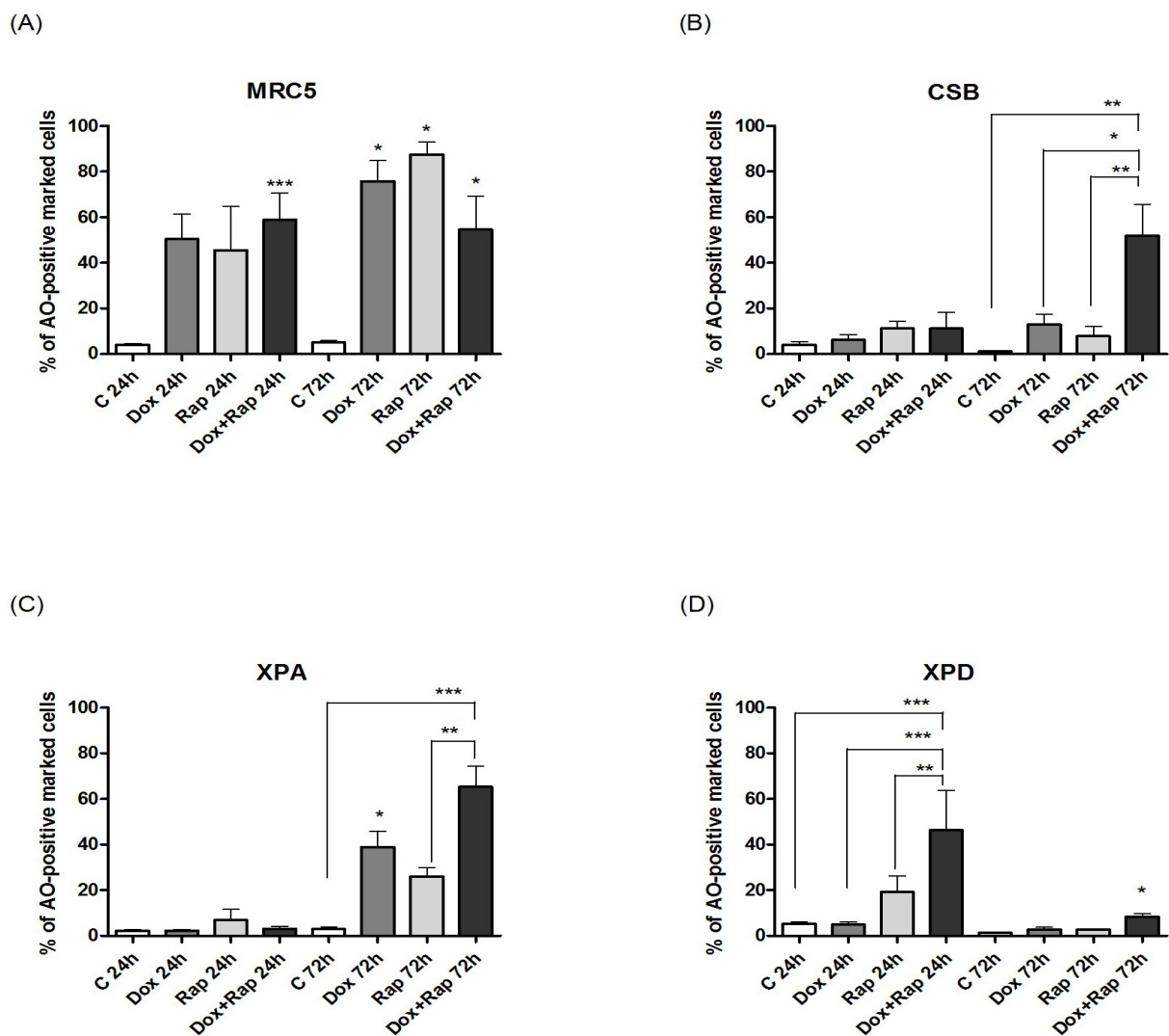


Figure 6. DOX induces autophagy in MRC5 and XPA cells. Cells were treated with DOX 0,05 mg/ml for 24h and 72h, followed by acridine orange (AO) staining and flow cytometry.

Percentage of cells with positive red fluorescence as analyzed by flow cytometry. SEM of three independent experiments; *p,0.05, **p,0.01, ***p,0.001. C-Control; Dox-Doxorubicin; Rap-Rapamycin; Dox+Rap-Co-treatment Doxorubicin and Rapamycin .

4.Discussion

DOX is a widely used drug in antitumor therapy, mainly for solid tumors, leukemias and lymphomas. Despite being classified as a topoisomerase II inhibitor, the activity of this drug is not limited to this mechanism. It can generate different types of DNA damage such as double breaks, inter- and intra-strand crosslinks, DNA adducts and free radicals formation, and thus induces several kind of processes (COLDWELL et al., 2008; MINOTTI et al., 2004; YANG et al., 2014).

For example at chronic exposure of many human hepatoma cell lines to a low dose of DOX induced a senescence and eventually underwent cell death through mitotic catastrophe, while high doses of DOX induced apoptosis (EOM et al., 2005). DOX also leads to the induction of autophagy in HepG2 cells (QIAN e YANG, 2009). Some results indicated that autophagy was the protective mechanism used by U2OS and Saos-2 osteosarcoma against DOX-induced apoptosis (ZHAO et al., 2014). In addition to the independent induction of each one, senescence and autophagy, the collateral induction of this two process have been demonstrated in leukemia, breast tumor, and colon carcinoma cells (GOEHE et al., 2012; YANG et al., 2012). Thus, it is important to establish which of the several effects observed with DOX (and other potential chemotherapeutic drugs) occur at different concentrations and whether these multiple effects are somehow linked.

Classically, NER is known for its activity in repair of DNA damage that lead to distortions of the double helix, such as those caused by UV-light. Some reports of our group and collaborators have demonstrated that human fibroblasts deficient in XPA, XPC and XPD are involved in the repair of anthracyclines-induced lesions, as XPA, XPC and XPD deficient cells are more sensitive to treatments with this class of drugs (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; SAFFI et al., 2010). However, so far little is known about the involvement of NER in induction of cellular processes in response to anticancer drugs such as doxorubicin.

Here we show that DOX, at relatively low dose of 0.05 µg/mL, induces cytotoxicity in NER-deficient and proficient cells through a mechanism that involves autophagy,

senescence and apoptosis. DOX-induced autophagy has also a negative effect on apoptosis, since cells with mitigated autophagy has an increase in apoptosis (Table 1).

DOX	MRC5	CSB	XPA	XPD
AUTOPHAGY	75/80	15	45	15
APOPTOSIS	35	65/70	50	50
SENESCENCE	75	15	50	15

Table 1. Approximate autophagy, senescence and apoptosis percentages induced by DOX-treatment (0.05 µg / ml -72h) found in this study.

As previously demonstrated (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; SAFFI et al., 2010) here we showed that besides of XPA and XPD, CSB is also necessary for the effective repair of anthracyclines-induced DNA lesions and cell survival, since cells deficient in these proteins are more sensitive to the cytotoxic effects and apoptosis induction of DOX treatment than MRC5 cells, which are proficient in DNA repair mechanisms (Figs. 1-2).

CSB cells showed the greatest sensitivity to DOX at low concentrations in MTT and Annexin-V assays. Even though it is involved in NER, CSB protein has a role in oxidative DNA damage repair. This can explain the higher sensitivity of CSB cells since DOX can induce ROS (D'ERRICO et al., 2013).

Doxorubicin has been previously shown to promote premature or accelerated senescence at relatively low doses in different cell lines (EOM et al., 2005; GOEHE et al., 2012; PIEGARI et al., 2013; VIGNERON et al., 2005; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011). This can be associated with both the reactive oxygen generation and with DNA damage response pathway (DI et al., 2009; GOEHE et al., 2012).

Here, we show that DOX at low doses induces senescence, after 72h of treatment in MRC5 and XPA cells, as evident from the development of cells that exhibit flattened and enlarged morphology, retain viability, and express high levels of the senescence marker p21, p16 and SA-b-gal. Similarly, we also observed an increase in the number of hours required for replication on average, and G2/M cell cycle arrest in cells with the senescent phenotype, revealing that DOX elicited antiproliferative effects at low doses. However, in CSB and XPD cells the senescence phenotype was not observed. Apparently, the fraction

of surviving cells would not allow for efficient activation of the appropriated checkpoint, hence no blocking the cell cycle occurred. Cell cycle arrest and senescence seems to act as a prosurvival mechanisms giving rise to less cell death.

Our results show that exposure of cells to DOX induces not only senescence but also autophagy in MRC5 and XPA cells. Likewise treatment with DOX did not lead to senescence in CSB and XPD and did not induce autophagy in these cells.

In this context, SCHEIBYE-KNUDSEN et al., (2012) demonstrated that CSB-deficient cells have an elevated mitochondrial metabolism and defective autophagy in response to mitochondrial stress, possibly caused by a defect in the recruitment of p62 to mitochondria as well as decreased mitochondrial ubiquitination. Consistent with an accumulation of damaged mitochondria, free radical formation is also increased in the CSB-deficient cells. The authors suggested that damage accumulates in these cells not only as a result of defective TCR-NER but, presumably, as a result of defect in BER as well. Remarkably, rapamycin was able to recover the bioenergetic profile of the CSB-deficient cells, and the authors suggest this drug as a possible treatment for this disease.

Rapamycin acts by inhibiting mTOR, a master inhibitor of autophagy (DÍAZ-TROYA et al., 2008). In accordance with Scheibye-Knudsen (2012), here we demonstrated that rapamycin, when combined with DOX, was also able to recover the autophagic process in CSB and XPD cells. However, it remains elusive if rapamycin will also recover the senescence process.

Our data consent the autophagy-senescence transition hypothesis, since we showed both, collateral induction of autophagy and senescence in MRC5 and XPA cells, and collateral blocking of this two processes in CSB and XPD cells. The absence of the senescent phenotype in CSB seems to be due to the involvement of this protein in mitophagy, as described above. Here we showed the first evidence of the possible involvement of XPD protein in this pathway. However, since we followed the senescence only up to 7 days after treatment, we cannot affirm that the senescent phenotype is completely abrogated or just delayed in these cells.

Apparently autophagy in this context appears as a cytoprotective mechanism, since DOX-induced autophagy protects cells against apoptosis by senescence induction. The data are in accordance with the view that autophagy is universal cytoprotective mechanism against DNA damaging chemotherapeutic agents (CHEN et al., 2011). By this way, if autophagy is inhibited, cells no longer undergo senescence and switch to the

apoptosis pathway (KNIZHNIK et al., 2013). Our results suggest that this could be what happening in XPD and CSB cells.

5. Conclusions

Despite the evidences of the involvement of CSB and XPD NER-proteins in the autophagy-senescence transition, the mechanism of how autophagy regulates senescence is still unclear. Senescence may require specific degradation of cellular components to establish the senescence phenotype, or autophagy serves as a source of building blocks for macromolecules synthesis in conditions of energy demand (WHITE e LOWE, 2009).

More studies are needed to identify the kind of specific DNA damage induced by DOX in NER- deficient cells that is responsible to a common trigger for these endpoints in order to elucidate the complex pathways involved. In addition, the possibility of rapamycin also being capable to rescue the senescence phenotype in CSB and XPD cells could be a big effort in therapy of patients with NER syndromes. Furthermore, the pathological inhibition of autophagy in some of the NER-deficient cells might represent a strategy for amelioration the killing effect of DOX in cancer therapy and thus to enhance therapeutic response.

6. Conflict of interest statement

None.

7. Acknowledgements

The authors would like to thank the brazilian funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS.

8. References

BERNT, K. M. et al. Enzyme-activated Prodrug Therapy Enhances Tumor-specific Replication of Adenovirus Vectors. **Cancer research**, v. 62, n. 21, p. 6089–98, 2002.

CAMERONI, E.; STETTLER, K. e SUTER, B. On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. **Cell division**, v. 5, p. 24, doi:10.1186/1747-1028-5-24, 2010.

CAPPARELLI, C. et al. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 12, p. 2285–302, doi:10.4161/cc.20718, 2012.

CARVALHO, H. et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 989–94, doi:10.1007/s00280-010-1244-x, 2010.

CHANG, B. D. et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. **Cancer research**, v. 59, n. 15, p. 3761–7, 1999.

CHEN, K. et al. Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells. **Anti-cancer drugs**, p. 1–11, doi:10.1097/CAD.000000000000089, 2014.

CHEN, L.-H. et al. Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 5, p. 594–605, doi:10.1016/j.bcp.2010.12.011, 2011.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3–34, 2003.

COLDWELL, K. E. et al. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 16, p. e100, doi:10.1093/nar/gkn439, 2008.

COSTA, R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083–1099, doi:10.1016/j.biochi.2003.10.017, 2003.

D'ERRICO, M. et al. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response.

Mechanisms of ageing and development, v. 134, n. 5-6, p. 261–9, doi:10.1016/j.mad.2013.03.006, 2013.

DI, X. et al. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 7, p. 1139–50, doi:10.1016/j.bcp.2008.12.016, 2009.

DÍAZ-TROYA, S. et al. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. **Autophagy**, v. 4, n. 7, p. 851–65, 2008.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M. e HOEIJMAKERS, J. H. J. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 772–80, doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.025, 2011.

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9363–7, 1995.

ELMORE, L. W. et al. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. **Clinical cancer research** □: an official journal of the American Association for Cancer Research, v. 11, n. 7, p. 2637–43, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1462, 2005.

EOM, Y.-W. et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. **Oncogene**, v. 24, n. 30, p. 4765–77, doi:10.1038/sj.onc.1208627, 2005.

GEWIRTZ, D. a. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. **Autophagy**, v. 5, n. 8, p. 1232–4, 2009.

GEWIRTZ, D. A. A partnership in search of definition. v. 9, n. 5, p. 808–812, 2013.

GOEHE, R. W. et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 763–78, doi:10.1124/jpet.112.197590, 2012.

GRAAT, H. C. A. et al. Different susceptibility of osteosarcoma cell lines and primary cells to treatment with oncolytic adenovirus and doxorubicin or cisplatin. **British journal of cancer**, v. 94, n. 12, p. 1837–44, doi:10.1038/sj.bjc.6603189, 2006.

KNIZHNIK, A. V et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy,

senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55665, doi:10.1371/journal.pone.0055665, 2013.

KURZ, D. et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 113, n. 20, p. 3613–3622, 2000.

LEVINE, B. e KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, doi:10.1016/j.cell.2007.12.018, 2008.

LUO, Y. et al. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 11, p. 860–7, doi:10.1016/j.exger.2011.07.005, 2011.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, doi:10.1124/pr.56.2.6, 2004.

MORAES, M. C. S. et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. **Cancer letters**, v. 314, n. 1, p. 108–18, doi:10.1016/j.canlet.2011.09.019, 2012.

MORIWAKI, S. Hereditary Disorders with Defective Repair of UV-Induced DNA Damage. **Japanese clinical medicine**, v. 4, p. 29–35, doi:10.4137/JCM.S10730, 2013.

PIEGARI, E. et al. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. **Basic research in cardiology**, v. 108, n. 2, p. 334, doi:10.1007/s00395-013-0334-4, 2013.

QI, M. et al. Pseudolaric Acid B[^]Induced Autophagy Contributes to Senescence via Enhancement of ROS Generation and Mitochondrial Dysfunction in Murine Fibrosarcoma L929 Cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 121, n. 3, p. 200–211, doi:10.1254/jphs.12269FP, 2013.

QIAN, H. e YANG, Y. Alterations of cellular organelles in human liver-derived hepatoma G2 cells induced by adriamycin. **Anti-cancer drugs**, v. 20, n. 9, p. 779–86, doi:10.1097/CAD.0b013e32832f4e6f, 2009.

RAPIN, I. **Disorders of nucleotide excision repair**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier B.V., 2013. v. 113p. 1637–50

SAFFI, J. et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. **DNA repair**, v. 9, n. 1, p. 40–7, doi:10.1016/j.dnarep.2009.10.003, 2010.

SASAKI, M. et al. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis. **Digestive diseases and sciences**, v. 57, n. 3, p. 660–6, doi:10.1007/s10620-011-1929-y, 2012.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M. et al. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 4, p. 855–69, doi:10.1084/jem.20111721, 2012.

VERMEULEN, W. e FOUSTERI, M. Mammalian transcription-coupled excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 8, p. a012625, doi:10.1101/cshperspect.a012625, 2013.

VIGNERON, A. et al. Src inhibits adriamycin-induced senescence and G2 checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1. **Cancer research**, v. 65, n. 19, p. 8927–35, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0461, 2005.

WHITE, E. e LOWE, S. W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 784–7, doi:10.1101/gad.1795309, 2009.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84–89, 2014.

YANG, M.-Y. et al. Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37205, doi:10.1371/journal.pone.0037205, 2012.

YOUNG, A. R. J. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 798–803, doi:10.1101/gad.519709, 2009.

ZHANG, Y. et al. DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 128, n. 3, p. 551–61, doi:10.1002/ijc.25365, 2011.

ZHAO, D. et al. Autophagy prevents doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 5, p. 1975–81, doi:10.3892/mmr.2014.2055, 2014.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nós avaliamos o possível envolvimento de proteínas do NER na transição autofagia-senescência induzida pela DOX. Os resultados foram apresentados no artigo intitulado “CSB and XPD are required for autophagy and senescence induced by doxorubicin”. As figuras complementares ao trabalho, não incluídas no manuscrito estão presentes no anexo I e exceto quando explicitado, as figuras citadas na discussão são as presentes neste anexo.

Alguns trabalhos demonstram que a participação ativa do NER e suas proteínas é necessária para o reparo de lesões induzidas por antraciclina. Uma vez que células deficientes em proteínas desta via de reparo (XPA, XPC e XPD) são mais sensíveis a estes compostos que células proficientes, estas proteínas estariam atuando na remoção dos adutos gerados (CARVALHO et al., 2010; MORAES et al., 2012; SAFFI et al., 2010). O enfoque nestes trabalhos geralmente é a capacidade destas drogas levar a morte celular, principalmente através da apoptose. O que também poderia sugerir um papel destas proteínas, quando funcionais, na prevenção da apoptose.

Além de levar a morte celular, DOX e outras antraciclina, também são capazes de desencadear outros desfechos celulares como por exemplo autofagia, catástrofe mitótica e senescência (EOM et al., 2005; REBBAA et al., 2003; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011; ZHAO et al., 2014). A participação do NER no desenvolvimento destes processos celulares em decorrência do tratamento com DOX ainda não foi avaliada. No presente trabalho, nós confirmamos a sensibilidade de fibroblastos humanos deficientes em NER (XPA e XPD) à DOX e demonstramos que células deficientes em CSB também foram mais sensíveis ao tratamento com DOX do que a linhagem proficiente nesse reparo, mesmo em concentrações bem baixas desta droga.

A morte celular pelo ensaio de anexina-V, foi avaliada de modo suplementar nos tempos de tratamento de 12 e 24h com DOX. Estes resultados (Fig. 1) demonstram que esses tempos de tratamentos não apresentam um percentual significativo de células mortas, em conjunto com os resultados de 72h de tratamento podemos inferir que a citotoxicidade da DOX aumenta de forma dependente do tempo e da dose dos tratamentos.

Afim de avaliar a indução de senescência nestas células nós utilizamos doses mais

baixas desta droga, dado que alguns trabalhos relatam uma indução de senescência preferencialmente em baixas doses (EOM et al., 2005). Como demonstrado na figura 3 do manuscrito, a indução de senescência aconteceu nas linhagens MRC5 e XPA, mas não em CSB e XPD. Neste ensaio utilizamos doses mais baixas que aquelas utilizadas no MTT afim de verificar se uma possível dependência na concentração da droga na indução de senescência não estaria ocorrendo em CSB e XPD. A figura 3, demonstra que isso não ocorreu.

Para avaliar se essa indução de senescência poderia estar envolvida especificamente com uma das sub-vias do NER, os ensaios de MTT e SA- β -gal foram realizados adicionalmente com a linhagem deficiente em XPC, proteína presente apenas no reconhecimento de lesão do GGR (MIN e PAVLETICH, 2007; SCHÄRER, 2013). Como podemos observar na figura 2A do anexo I, XPC também apresenta sensibilidade ao tratamento de 72h com DOX. Da mesma forma, DOX induz senescência na linhagem deficiente em XPC, indicando o reconhecimento de dano no GGR provavelmente não está envolvido no mecanismo de senescência celular.

Ensaio preliminares SA- β -gal também foram realizados em fibroblastos primários AS539 deficiente em CSB, e AS405 proficiente no NER. Na figura 3, podemos observar que o mesmo padrão de resposta foi observado para estas células após o tratamento com DOX. Nas células proficientes no NER (AS405), nós observamos indução de senescência celular em todas as doses utilizadas. No entanto, da mesma forma que na linhagem transformada, a deficiência em CSB parece bloquear/atenuar a senescência celular também nas células primárias deficientes nesta proteína.

A análise do ciclo celular foi realizada adicionalmente com uma linhagem celular deficiente em XPD (XP6BE-SV) complementada com cDNA do gene XPD funcional usando retrovírus recombinantes como descrito em (QUILLIET et al., 1996). Os resultados demonstram que a *re-expressão* de XPD funcional restaura a parada do ciclo celular em G2/M (Fig.4). Este dado sugere que o fenótipo senescente poderia ser recuperado por esta complementação, corroborando com a ideia/hipótese de um envolvimento desta proteína no processo de senescência celular.

Além do seu papel no NER, a proteína XPD também participa de outros processos fundamentais como a transcrição e o controle do ciclo celular, agindo como um regulador da proliferação celular. Estudos em *Drosophila* indicam que baixos níveis de XPD, facilitam a progressão da mitose (CHEN et al., 2003). Quando super expressa, XPD

causou uma parada no ciclo celular, bem como o seu silenciamento resultou no aumento da taxa de divisões celulares (CAMERONI, STETTLER e SUTER, 2010). Durante a resposta ao dano no DNA, altos níveis de XPD assegurariam a integridade do complexo TFIIH suportando o reparo, e ao mesmo tempo preveniriam a divisão celular indevida por sequestrar o complexo ativador de ciclinas, CAK.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados aqui, em que células deficientes em XPD não apresentaram fenótipo senescente, sugerindo que essas células continuam a proliferar mesmo com DNA danificado, levando a morte celular. Esta resposta é confirmada com o ensaio “population doubling time” (PDT), onde as células deficientes em XPD não apresentaram um aumento no número de horas necessário para duplicação após o tratamento com DOX.

Na tentativa de explicar a ausência de senescência em células deficientes em CSB ou XPD, nós avaliamos a possibilidade da transição autofagia-senescência, no tratamento com a DOX. Apesar da maior parte da literatura relatar esse tipo de transição, CAPPARELLI et al., 2012 validaram a existência da transição senescência-autofagia, e sugerem que este tipo de mecanismo poderia gerar um microambiente fértil para facilitar o crescimento tumoral. No presente estudo, nós não fizemos um acompanhamento temporal prolongado dos processos de autofagia e senescência. No entanto, a participação de XPD na progressão do ciclo celular poderia sugerir que XPD está envolvida nesta transição senescência-autofagia, uma vez que sua deficiência está associada à perda do controle proliferativo, e como observado por nós aqui a supressão do fenótipo senescente e da manutenção processo autofágico.

SCHEIBYE-KNUDSEN e colaboradores (2012) demonstraram o envolvimento de CSB na prevenção do acúmulo de mitocôndrias danificadas através da promoção da mitofagia. A avaliação realizada do processo autofágico neste trabalho ainda é preliminar, uma vez que a análise de outros marcadores é necessária para a confirmação destes resultados. O aumento da formação de vesículas autofágicas pode indicar tanto a promoção da autofagia como uma interferência na degradação de vesículas, neste sentido ensaios para avaliar o fluxo autofágico através da degradação de p62 e a formação de LC3-II ainda são necessários (KLIONSKY et. al., 2012)

Na tentativa de acompanhar um fluxo do processo autofágico nas células deficientes no NER o ensaio de marcação dos vacúolos ácidos foi realizado após tratamento de 4h, 24h, e 72h com DOX e rapamicina (indutora de autofagia por inibir a via

mTOR). A figura 5, representa o tempo de 4h de tratamento, os demais tempos estão na figura 6 do manuscrito. Em 4h de tratamento rapamicina não foi capaz de elevar a marcação de vesículas autofágicas em nenhuma das linhagens, nem no co-tratamento com DOX. O tratamento de 4h com DOX, levou a um aumento na marcação de vesículas autofágicas em células deficientes em XPD que parece diminuir com o aumento do tempo de tratamento. Esse resultado pode indicar, as células deficientes nesta proteína entram em autofagia mas não conseguem sustentar o processo por muito tempo. Isto estaria de acordo com a hipótese da transição senescência-autofagia, na perda do fenótipo senescente pela linhagem deficiente em XPD onde o processo autofágico seria suprimido.

Na linhagem CSB, não observamos indução significativa de autofagia em nenhum dos tempos utilizados do tratamento com DOX. Assim como demonstrado por SCHEIBYE-KNUDSEN e colaboradores (2012), aqui a proteína CSB pareceu ser fundamental para a indução do processo autofágico induzido pela DOX.

GOEHE e colaboradores (2012) e DI e colaboradores (2009) sugerem que DOX está induzindo autofagia e senescência colateralmente através da formação de ROS. Eles observaram um aumento tempo dependente na formação de ROS em células MCF-7 expostas à DOX, e ainda que senescência e autofagia foram colateralmente atenuados na presença dos *scavengers* de radicais livres glutationa (GSH) ou N-acetil cisteína (NAC) . Além disso LUO e colaboradores (2011) mostraram que o aumento de autofagia em decorrência de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, acontece por uma via independente do *feedback* negativo da via de mTOR, sendo regulada pela via p21 e ativação da via p38 MAPK α (p38 *mitogen-activated protein kinase* α). Apesar não termos avaliado no presente estudo o tipo específico de dano causado pela DOX nas linhagens deficientes em NER, é possível que a formação de ROS seja o responsável por desencadear autofagia e senescência em MRC5 e XPA. A recuperação do processo autofágico em XPD e CSB só aconteceu no co-tratamento de DOX com rapamicina. Ainda que não possuímos evidências diretas, estes dados podem sugerir que pela participação destas proteínas nos processos de autofagia e senescência, o resgate da indução de autofagia só ocorre na presença de um estímulo muito grande, quando ativadas duas vias efetoras diferentes como por exemplo mTOR e p38 MAPK α .

Na linhagem MRC5, o tratamento de 4h com DOX foi capaz de levar a um pequeno aumento na marcação de vesículas autofágicas. Isto sugere que nesta linhagem proficiente no NER o processo autofágico é dependente do aumento no tempo de

tratamento, que deve levar a uma maior indução de danos pela DOX. Uma vez que aumento aconteceu de forma crescente com o maior tempo de exposição à droga.

KNIZHNIK e colaboradores (2013) propõem que em linhagens de glioblastoma tratadas com termozolamida, a autofagia e a senescência precedem a apoptose, e que a modulação destes processos pode ter um impacto no nível de morte celular. Eles observaram que a indução de autofagia começa a ser significativa após 72h de tratamento, chegando a um máximo em 96h e então começa a decrescer. A senescência celular começa a ser induzida após 72h de tratamento e então aumenta com o tempo, enquanto a apoptose é a última resposta a ser desencadeada e começa a ser significativa após 120h após o tratamento. GOEHE e colaboradores (2012) também demonstraram que a indução de autofagia e senescência ocorre de maneira tempo-dependente, com aumento significativo destes processos após 72h de tratamento com DOX.

Os resultados encontrados por estes autores, concordam com os obtidos por nós no presente estudo. Aqui, demonstramos a ausência de senescência e da autofagia em células CSB e XPD, bem como a indução colateral destes processos em MRC5 e XPA após tratamento de 72h com DOX, no entanto não avaliamos estes processos em um período maior de tempo para afirmar em que momento atingem um platô. Como podemos observar na Tabela 1, o mesmo percentual de células que apresentam autofagia, também apresentam senescência e quando estes dois processos estão ausentes há um desvio para a apoptose. Sugerindo que aqui, autofagia pode ter um papel citoprotetor desviando as células da apoptose por levar a senescência, ou que ainda estas proteínas teriam um papel na modulação da apoptose.

DOX	MRC5	CSB	XPA	XPD
AUTOFAGIA	75/80	15	43	13
APOPTOSE	35	65/70	50	50
SENESCÊNCIA	75	15	50	15

Tabela 1. Percentual de autofagia, apoptose e senescência induzidos pelo tratamento de 0,05 µg/ml de DOX por 72h encontrados neste trabalho.

Pelo já descrito papel de CSB na mitofagia, e pela ausência deste processo em todos os tempos observados, poderíamos inferir que a anulação ocorreu em decorrência

de um possível papel desta proteína na transição autofagia-senescência. Seria prematuro afirmar o mesmo para XPD, uma vez que a hipótese de transição senescência-autofagia não pode ser descartada.

Independente da direção deste processo transitório, os resultados aqui são relevantes no sentido de demonstrarem a correlação destes processos em modelos onde estes são suprimidos de maneira patológica, e não através de manipulação farmacológica ou genética. Apresentando desta forma, mais uma possível importância desta transição para a manutenção da fisiologia normal do organismo.

Os resultados deste trabalho, podem ser correlacionados com o fenótipo dos pacientes afetados pela Síndrome Cockayne (CS). Dentre algumas das características desta doença, está o envelhecimento precoce a presença de sintomas neurológicos, e diferentemente dos pacientes com Xeroderma pigmentosum (XP), pacientes CS não tem incidência elevada de câncer (RAPIN, 2013). Poderíamos supor que a ausência da transição autofagia-senescência destes pacientes esta relacionada com o grande aumento de apoptose nos pacientes CS, e que isso leva a degeneração dos tecidos precocemente e suprime a tumorigênese. A hipótese de que a via TC-NER teria um papel prevenindo a morte celular já foi descrita para explicar o fenótipo dos pacientes CS (DIDERICH, ALANAZI e HOEIJMAKERS, 2011). Além disso, o tratamento com rapamicina poderia recuperar a autofagia, e por sua vez o fenótipo senescente, protegendo uma demasiada resposta apoptótica e abrandando os sintomas destes pacientes.

Um aspecto interessante da interação entre autofagia e senescência, é abordada por GEWIRTZ (2009), no artigo intitulado “Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy”. Neste trabalho, o autor desenvolve a ideia de que autofagia e senescência podem ser respostas acopladas que influenciam a capacidade da célula tumoral de manter um prolongado estado de parada no crescimento que pode ser sucedido pelo novo crescimento do tumor e recorrência da doença.

O autor postula um modelo, onde a autofagia inicial em resposta ao estresse induzido por quimioterápicos, é citoprotetora. Quando o estresse é excessivo, a autofagia é insuficiente para manter as células protegidas em uma prolongada parada de crescimento e as células conseqüentemente morrem por apoptose ou catástrofe mitótica. Alternativamente a autofagia pode ser sucedida por um segundo tipo de resposta protetora, a senescência onde as células permanecem metabolicamente ativas mas a maior parte das células não consegue retornar ao ciclo celular, e acaba sendo eliminada

em parte pelo sistema imunológico. Independente do tipo de proteção conferida, dada a heterogeneidade da população celular do tumor, pelo menos uma pequena subpopulação possivelmente com características de células tronco, readquire a capacidade de retornar ao ciclo celular. Este modelo seria aplicado na dormência tumoral e recorrência da doença após um período de latência.

Podemos extrapolar este modelo, sugerindo que além de autofagia e senescência, algumas proteínas envolvidas no NER também apresentam um papel citoprotetor no contexto tumoral permitindo que ocorra uma evasão da apoptose/morte celular. Associado à isto, também devemos considerar que alguns tumores apresentam superexpressão de proteínas envolvidas em vias de reparo. Por exemplo, já foi relatada a superexpressão de CSB em células tumorais de diferentes tecidos, promovendo resistência a apoptose e promovendo crescimento tumoral (CAPUTO et al., 2013). Assim, embora precipitado, poderíamos hipotetizar que CSB superexpressa poderia estar associada na resistência à apoptose por causar um aumento na autofagia e conseqüentemente na senescência, permitindo um estado de dormência tumoral. Desta forma, atuar na modulação desta proteína, poderia ser um alvo atrativo para a terapia tumoral.

Neste trabalho, reportamos um possível papel do NER (CSB e XPD), nos processos de autofagia e senescência bem como na sua transição autofagia-senescência, demonstrando a interação entre vias de morte e sobrevivência celular. Embora nossos resultados sugiram a existência de uma relação entre autofagia e senescência, não podemos descartar que os dois processos podem apenas estar sendo desencadeados por vias similares de sinalização que os afetam de forma independentemente. A figura 6 representa um modelo resumido para os resultados encontrados aqui. Muitas questões ainda precisam ser respondidas em relação as vias moleculares que interligam estas respostas. A compreensão de respostas celulares induzidas por drogas quimioterápica fornece informações úteis na elaboração de esquemas, bem como no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de câncer. Os resultados apresentados sugerem um papel importante do NER na resistência ao tratamento com antraciclinas encontrada na terapia clínica, bem como a relevância de se investigar os mecanismos que levam a célula a escapar de morte celular e se transformar em célula tumoral de forma conjunta.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o sistema de reparo por excisão de nucleotídios (NER) exerce um papel importante no processamento das lesões induzidas pelas DOX em fibroblastos humanos, bem como o provável envolvimento de CSB e XPD na sinalização da transição autofagia-senescência. Especificamente, pode-se concluir que:

- As linhagens celulares CSB, XPA, XPC e XPD apresentam uma maior sensibilidade à DOX, em relação à linhagem MRC5.
- CSB, XPA e XPD em grande parte morrem pelo mecanismo de apoptose, quando tratadas com DOX.
- As linhagens MRC5, XPA e XPC são induzidas à senescência celular perante os tratamentos utilizados.
- O tratamento com DOX também induziu autofagia em MRC5 e XPA.
- DOX não induz senescência em CSB e XPD, o que pode ser devido ao envolvimento destas proteínas no processo de transição autofagia-senescência ou ainda devido as funções desempenhadas destas proteínas fora do NER.

PERSPECTIVAS

Os resultados aqui obtidos levantaram questões a serem respondidas. Para tanto, outros ensaios precisam ser realizados para melhor compreensão da relação do NER no processo de transição autofagia senescência.

Como perspectivas principais da continuação desse trabalho, destacam-se:

- Caracterizar o tipo de dano induzido pela DOX nas linhagens estudadas. Avaliar formação de ROS por DCFH-DA , quantificar a formação de complexo DNA-TopII através do ensaio Tardis Assay e utilizar a ferramenta de espectrometria de massas para detectar a formação de adutos;
- Caracterizar a sinalização de dano envolvida na citotoxicidade induzida pela DOX;
- Analisar a indução de senescência nas linhagens CSB e XPD, após co-tratamento com DOX e rapamicina;
- Verificar uma possível correlação temporal de senescência, autofagia e apoptose, realizando os ensaios à longo prazo;
- Complementar a análise da autofagia induzida tanto por DOX como pelo co-tratamento com rapamicina, através de avaliação de proteínas como LC3II e p62, bem como de proteínas envolvidas na regulação deste processo como por exemplo mTOR e p38 MAPK α ;
- Avaliar o acúmulo de mitocôndrias, e alterações da permeabilidade mitocondrial para verificar a presença de mitofagia;
- Confirmar os resultados encontrados em células primárias deficientes em CSB e XPD, e avaliar a recuperação do fenótipo em células complementadas com XPD e CBS;
- Realizar análise de morfologia nuclear (NMA) para observar a indução de catástrofe mitótica no tratamento com DOX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAMANN, M. D. et al. Multiple interaction partners for Cockayne syndrome proteins: implications for genome and transcriptome maintenance. **Mechanisms of ageing and development**, v. 134, n. 5-6, p. 212–24, doi:10.1016/j.mad.2013.03.009, 2013.
- ALERS, S. et al. The incredible ULKs. **Cell communication and signaling** □: **CCS**, v. 10, n. 1, p. 7, doi:10.1186/1478-811X-10-7, 2012.
- BODNAR, A. G. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 349–352, doi:10.1126/science.279.5349.349, 1998.
- BORDIN, D. L. et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. **Mutation research**, v. 753, n. 2, p. 91–9, doi:10.1016/j.mrrev.2013.07.001, 2013.
- BUECHNER, C. N. et al. Strand-specific Recognition of DNA Damages by XPD Provides Insights into Nucleotide Excision Repair Substrate Versatility. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 6, p. 3613–24, doi:10.1074/jbc.M113.523001, 2014.
- CAMERONI, E.; STETTLER, K. e SUTER, B. On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. **Cell division**, v. 5, p. 24, doi:10.1186/1747-1028-5-24, 2010.
- CAMPISI, J. e D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 9, p. 729–40, doi:10.1038/nrm2233, 2007.
- CAPPARELLI, C.; GUIDO, C.; et al. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 12, p. 2285–302, doi:10.4161/cc.20718, 2012.
- CAPPARELLI, C.; CHIAVARINA, B.; et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, “fueling” tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 19, p. 3599–610, doi:10.4161/cc.21884, 2012.
- CAPUTO, M. et al. The CSB repair factor is overexpressed in cancer cells, increases

apoptotic resistance, and promotes tumor growth. **DNA repair**, v. 12, n. 4, p. 293–9, doi:10.1016/j.dnarep.2013.01.008, 2013.

CARVALHO, H. et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 989–94, doi:10.1007/s00280-010-1244-x, 2010.

CHAKHPARONIAN, M. e WELLINGER, R. J. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? **Trends in genetics**: **TIG**, v. 19, n. 8, p. 439–46, doi:10.1016/S0168-9525(03)00135-5, 2003.

CHANDECK, C. e MOOI, W. J. Oncogene-induced cellular senescence. **Advances in anatomic pathology**, v. 17, n. 1, p. 42–8, doi:10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e, 2010.

CHANG, B.-D. et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 389–94, doi:10.1073/pnas.012602599, 2002.

CHEN, J. et al. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. **Nature**, v. 424, n. 6945, p. 228–32, doi:10.1038/nature01746, 2003.

CHEN, J. et al. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 3, p. 973–83, doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.033, 2012.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3–34, 2003.

CHRISTOPHER SELBY AND AZIZ SANCAR. **Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II**. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/94/21/11205.full.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2014.

CLEAVER, J. E. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 7, p. 564–73, doi:10.1038/nrc1652, 2005.

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T. e REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 11, p. 756–68, doi:10.1038/nrg2663, 2009.

COLLADO, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. **Nature**, v. 436,

n. 7051, p. 642, doi:10.1038/436642a, 2005.

COMPE, E. e EGLY, J.-M. TFIIH: when transcription met DNA repair. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 6, p. 343–54, doi:10.1038/nrm3350, 2012.

COPPÉ, J.-P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. 2853–68, doi:10.1371/journal.pbio.0060301, 2008.

COSTA, R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083–1099, doi:10.1016/j.biochi.2003.10.017, 2003.

CUERVO, A. M. Autophagy and aging: keeping that old broom working. **Trends in genetics** □: **TIG**, v. 24, n. 12, p. 604–12, doi:10.1016/j.tig.2008.10.002, 2008.

CUTTS, S. M. et al. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. **IUBMB life**, v. 57, n. 2, p. 73–81, doi:10.1080/15216540500079093, 2005.

D'ADDA DI FAGAGNA, F. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 194–8, doi:10.1038/nature02118, 2003.

D'ADDA DI FAGAGNA, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 7, p. 512–22, doi:10.1038/nrc2440, 2008.

D'ERRICO, M. et al. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. **Mechanisms of ageing and development**, v. 134, n. 5-6, p. 261–9, doi:10.1016/j.mad.2013.03.006, 2013.

DEMASTERS, G. A. et al. Potentiation of cell killing by fractionated radiation and suppression of proliferative recovery in MCF-7 breast tumor cells by the Vitamin D3 analog EB 1089. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 5, p. 365–74, doi:10.1016/j.jsbmb.2004.07.011, 2004.

DI, X. et al. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 7, p. 1139–50, doi:10.1016/j.bcp.2008.12.016, 2009.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M. e HOEIJMAKERS, J. H. J. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 772–80, doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.025, 2011.

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9363–7, 1995.

EISEN, J. A. e HANAWALT, P. C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. **Mutation research**, v. 435, n. 3, p. 171–213, 1999.

ELMORE, L. W. et al. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. **Clinical cancer research** □: an official journal of the American Association for Cancer Research, v. 11, n. 7, p. 2637–43, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1462, 2005.

EOM, Y.-W. et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. **Oncogene**, v. 24, n. 30, p. 4765–77, doi:10.1038/sj.onc.1208627, 2005.

EVANS, E. et al. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. **The EMBO journal**, v. 16, n. 21, p. 6559–73, doi:10.1093/emboj/16.21.6559, 1997.

EWALD, J. et al. Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo. **British journal of cancer**, v. 98, n. 7, p. 1244–9, doi:10.1038/sj.bjc.6604288, 2008.

FAGHRI, S. et al. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. **Journal of medical genetics**, v. 45, n. 10, p. 609–21, doi:10.1136/jmg.2008.058743, 2008.

FORREST, R. a et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 12, p. 1602–12, doi:10.1016/j.bcp.2012.02.026, 2012.

GEWIRTZ, D. a. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. **Autophagy**, v. 5, n. 8, p. 1232–4, 2009.

GEWIRTZ, D. A. A partnership in search of definition. v. 9, n. 5, p. 808–812, 2013.

GILLET, L. C. J. e SCHÄRER, O. D. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. **Chemical reviews**, v. 106, n. 2, p. 253–76, doi:10.1021/cr040483f, 2006.

GLICK, D.;; BARTH, S. e MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, doi:10.1002/path.2697, 2010.

GOEHE, R. W. et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 763–78, doi:10.1124/jpet.112.197590, 2012.

GORGOU LIS, V. G. e HALAZONETIS, T. D. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 6, p. 816–27, doi:10.1016/j.ceb.2010.07.013, 2010.

HANAWALT, P. C. e SPIVAK, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 958–70, doi:10.1038/nrm2549, 2008.

HASHIMOTO, S. e EGLY, J. M. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. **Human molecular genetics**, v. 18, n. R2, p. R224–30, doi:10.1093/hmg/ddp390, 2009.

HAYFLICK, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. **Experimental cell research**, v. 37, p. 614–36, 1965.

HAYFLICK, L. e MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental cell research**, v. 25, p. 585–621, 1961.

HERBIG, U. et al. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). **Molecular cell**, v. 14, n. 4, p. 501–13, 2004.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–74, doi:10.1038/35077232, 2001.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475–85, doi:10.1056/NEJMra0804615, 2009.

ITIN, P. H.;; SARASIN, A. e PITTELKOW, M. R. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 6, p. 891–920; quiz 921–4, doi:10.1067/mjd.2001.114294, 2001.

JONES, K. R. et al. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation

in breast tumour cells. **International journal of radiation biology**, v. 81, n. 6, p. 445–58, 2005.

KAMENISCH, Y. et al. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 2, p. 379–90, doi:10.1084/jem.20091834, 2010.

KANG, H. T. et al. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23367, doi:10.1371/journal.pone.0023367, 2011.

KEMP, M. G. et al. Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 27, p. 22889–99, doi:10.1074/jbc.M112.374447, 2012.

KIM SH, S.;; KAMINKER, P. e CAMPISI, J. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. **Oncogene**, v. 21, n. 4, p. 503–11, doi:10.1038/sj.onc.1205077, 2002.

KNIZHNIK, A. V et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55665, doi:10.1371/journal.pone.0055665, 2013.

KRAEMER, K. H. et al. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1388–96, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.020, 2007.

KROEMER, G.;; MARIÑO, G. e LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 280–93, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023, 2010.

KROKAN, H. E.;; KAVLI, B. e SLUPPHAUG, G. Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 82, n. 5, p. 280–97, doi:10.1007/s00109-004-0528-1, 2004.

KUILMAN, T. et al. The essence of senescence. **Genes & development**, v. 24, n. 22, p. 2463–79, doi:10.1101/gad.1971610, 2010.

KUNG, C.-P. et al. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 21, n. 1, p. 71–100, 2011.

KURZ, D. et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 113,

n. 20, p. 3613–3622, 2000.

LEBEDEV, A.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. e IBEN, S. Truncated Cockayne syndrome B protein represses elongation by RNA polymerase I. **Journal of molecular biology**, v. 382, n. 2, p. 266–74, doi:10.1016/j.jmb.2008.07.018, 2008.

LEE, B. Y. et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. **Aging cell**, v. 5, n. 2, p. 187–95, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x, 2006.

LEE, J.; GIORDANO, S. e ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **The Biochemical journal**, v. 441, n. 2, p. 523–40, doi:10.1042/BJ20111451, 2012.

LEE, J.-H. et al. NMR study on the interaction between RPA and DNA decamer containing cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer in the presence of XPA: implication for damage verification and strand-specific dual incision in nucleotide excision repair. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 16, p. 4747–54, 2003.

LEHMANN, A. R. The xeroderma pigmentosum group D (XPB) gene: one gene, two functions, three diseases. **Genes & Development**, v. 15, n. 1, p. 15–23, doi:10.1101/gad.859501, 2001.

LEHMANN, A. R. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 730–3, doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.023, 2011.

LEVINE, B. e KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, doi:10.1016/j.cell.2007.12.018, 2008.

LINDENBAUM, Y. et al. Xeroderma pigmentosum/cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases. **European journal of paediatric neurology** □: **EJPN** □: official journal of the European Paediatric Neurology Society, v. 5, n. 6, p. 225–42, doi:10.1053/ejpn.2001.0523, 2001.

LUO, Y. et al. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 11, p. 860–7, doi:10.1016/j.exger.2011.07.005, 2011.

MACKENZIE, K. L. et al. Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. **Experimental cell**

research, v. 259, n. 2, p. 336–50, doi:10.1006/excr.2000.4982, 2000.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V. e WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 12, p. 961–7, doi:10.1038/nrc2254, 2007.

MCKAY, B. C. e CABRITA, M. A. Arresting transcription and sentencing the cell: the consequences of blocked transcription. **Mechanisms of ageing and development**, v. 134, n. 5-6, p. 243–52, doi:10.1016/j.mad.2013.03.003, 2013.

MICHALOGLOU, C. et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 720–4, doi:10.1038/nature03890, 2005.

MIN, J.-H. e PAVLETICH, N. P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 570–5, doi:10.1038/nature06155, 2007.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, doi:10.1124/pr.56.2.6, 2004.

MITCHELL, J. R.; HOEIJMAKERS, J. H. J. e NIEDERNHOFER, L. J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 2, p. 232–40, 2003.

MORAES, M. C. S. et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. **Cancer letters**, v. 314, n. 1, p. 108–18, doi:10.1016/j.canlet.2011.09.019, 2012.

MORIWAKI, S. Hereditary Disorders with Defective Repair of UV-Induced DNA Damage. **Japanese clinical medicine**, v. 4, p. 29–35, doi:10.4137/JCM.S10730, 2013.

MORIWAKI, S. e KRAEMER, K. H. Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 17, n. 2, p. 47–54, 2001.

MOSER, J. et al. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. **Molecular cell**, v. 27, n. 2, p. 311–23, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.014, 2007.

MOYZIS, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 18, p. 6622–6, 1988.

MUFTUOGLU, M. et al. Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 14, p. 9270–9, doi:10.1074/jbc.M807006200, 2009.

NAEGELI, H.; BARDWELL, L. e FRIEDBERG, E. The DNA helicase and adenosine triphosphatase activities of yeast Rad3 protein are inhibited by DNA damage. A potential mechanism for damage- specific recognition. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 1, p. 392–398, 1992.

NARITA, M. et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 703–16, 2003.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling and autophagy: Cell death vs Survival. **Antioxidants & redox signaling**, doi:10.1089/ars.2014.5837, 2014.

NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells□: Nucleotide excision repair: variations on versatility. **Cellular and molecular life sciences□: CMLS**, v. 66, n. 6, p. 994–1009, doi:10.1007/s00018-009-8737-y, 2009.

OGI, T. et al. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. **Molecular cell**, v. 37, n. 5, p. 714–27, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.009, 2010.

OHTANI, N.; MANN, D. J. e HARA, E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. **Cancer science**, v. 100, n. 5, p. 792–7, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01123.x, 2009.

OLSEN, C. L. et al. Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. **Oncogene**, v. 21, n. 41, p. 6328–39, doi:10.1038/sj.onc.1205780, 2002.

PARK, C.-J. e CHOI, B.-S. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. **The FEBS journal**, v. 273, n. 8, p. 1600–8, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05189.x, 2006.

PUGH, R. A.; WU, C. G. e SPIES, M. Regulation of translocation polarity by helicase domain 1 in SF2B helicases. **The EMBO journal**, v. 31, n. 2, p. 503–14, doi:10.1038/emboj.2011.412, 2012.

QUILLIET, X. et al. Long-term complementation of DNA repair deficient human primary

fibroblasts by retroviral transduction of the XPD gene. **Mutation research**, v. 364, n. 3, p. 161–9, 1996.

RABINOWITZ, J. D. e WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6009, p. 1344–8, doi:10.1126/science.1193497, 2010.

RAPIN, I. **Disorders of nucleotide excision repair**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier B.V., 2013. v. 113p. 1637–50

REBBAA, A. et al. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. **Oncogene**, v. 22, n. 18, p. 2805–11, doi:10.1038/sj.onc.1206366, 2003.

REGGIORI, F. et al. Autophagy: more than a nonselective pathway. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 219625, doi:10.1155/2012/219625, 2012.

ROBERSON, R. S. et al. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. **Cancer research**, v. 65, n. 7, p. 2795–803, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1270, 2005.

RODIER, F. et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. **Nature cell biology**, v. 11, n. 8, p. 973–9, doi:10.1038/ncb1909, 2009.

RODIER, F. et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 1, p. 68–81, doi:10.1242/jcs.071340, 2011.

RODIER, F. e CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **The Journal of cell biology**, v. 192, n. 4, p. 547–56, doi:10.1083/jcb.201009094, 2011.

ROUILLON, C. e WHITE, M. F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. **Research in microbiology**, v. 162, n. 1, p. 19–26, doi:10.1016/j.resmic.2010.09.003, 2011.

SAFFI, J. et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. **DNA repair**, v. 9, n. 1, p. 40–7, doi:10.1016/j.dnarep.2009.10.003, 2010.

SALAMA, R. et al. Cellular senescence and its effector programs. **Genes & development**, v. 28, n. 2, p. 99–114, doi:10.1101/gad.235184.113, 2014.

SARANGI, U. et al. 17AAG Treatment Accelerates Doxorubicin Induced Cellular Senescence: Hsp90 Interferes with Enforced Senescence of Tumor Cells. **Drug target insights**, v. 6, p. 19–39, doi:10.4137/DTI.S9943, 2012.

SASAKI, M. et al. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 90, n. 6, p. 835–43, doi:10.1038/labinvest.2010.56, 2010.

SASAKI, M. et al. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis. **Digestive diseases and sciences**, v. 57, n. 3, p. 660–6, doi:10.1007/s10620-011-1929-y, 2012.

SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. a012609, doi:10.1101/cshperspect.a012609, 2013.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M. et al. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 4, p. 855–69, doi:10.1084/jem.20111721, 2012.

SERRANO, M. The tumor suppressor protein p16INK4a. **Experimental cell research**, v. 237, n. 1, p. 7–13, doi:10.1006/excr.1997.3824, 1997.

SPENCER, D. M. S. et al. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. **Mutation research**, v. 638, n. 1-2, p. 110–21, doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.09.005, 2008.

SPIVAK, G. e HANAWALT, P. C. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. **DNA repair**, v. 5, n. 1, p. 13–22, doi:10.1016/j.dnarep.2005.06.017, 2006.

SRIDHAR, S. et al. Autophagy and disease: always two sides to a problem. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 2, p. 255–73, doi:10.1002/path.3025, 2012.

STARESINCIC, L. et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. **The EMBO journal**, v. 28, n. 8, p. 1111–20, doi:10.1038/emboj.2009.49, 2009.

STEIN, G. H. et al. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in

the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 2109–17, 1999.

SUGASAWA, K. Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 1, p. 16–23, doi:10.1134/S0006297911010044, 2011.

TAPIAS, A. et al. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 18, p. 19074–83, doi:10.1074/jbc.M312611200, 2004.

TOOZE, S. A. e YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nature cell biology**, v. 12, n. 9, p. 831–5, doi:10.1038/ncb0910-831, 2010.

VARGAS, J. et al. Senescence; an endogenous anticancer mechanism. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 17, n. 2, p. 2616–43, doi:10.1002/mus.23999, 2012.

VELLAI, T. et al. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? **Trends in cell biology**, v. 19, n. 10, p. 487–94, doi:10.1016/j.tcb.2009.07.007, 2009.

VERMEULEN, W. e FOUSTERI, M. Mammalian transcription-coupled excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 8, p. a012625, doi:10.1101/cshperspect.a012625, 2013.

VIJG, J. Aging genomes: A necessary evil in the logic of life. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, doi:10.1002/bies.201300127, 2014.

WANG, Y. et al. p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition. **Oncogene**, v. 23, n. 6, p. 1283–90, doi:10.1038/sj.onc.1207244, 2004.

WANG, Y. et al. Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic RAS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13325–30, doi:10.1073/pnas.1120193109, 2012.

WHITE, E. e LOWE, S. W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 784–7, doi:10.1101/gad.1795309, 2009.

WOLSKI, S. C. et al. Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. **PLoS biology**, v. 6, n. 6, p. e149, doi:10.1371/journal.pbio.0060149,

2008.

WONG, H.-K. et al. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 12, p. 4103–13, doi:10.1093/nar/gkm404, 2007.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84–89, 2014.

YANG, M.-Y. et al. Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37205, doi:10.1371/journal.pone.0037205, 2012.

YOUNG, A. R. J. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 798–803, doi:10.1101/gad.519709, 2009.

YOUNG, A. R. e NARITA, M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 234–40, doi:10.1016/j.ceb.2009.12.005, 2010.

ZHANG, Y. et al. DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 128, n. 3, p. 551–61, doi:10.1002/ijc.25365, 2011.

ZHAO, D. et al. Autophagy prevents doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 5, p. 1975–81, doi:10.3892/mmr.2014.2055, 2014.

ANEXO I

Figuras complementares

Figura 1

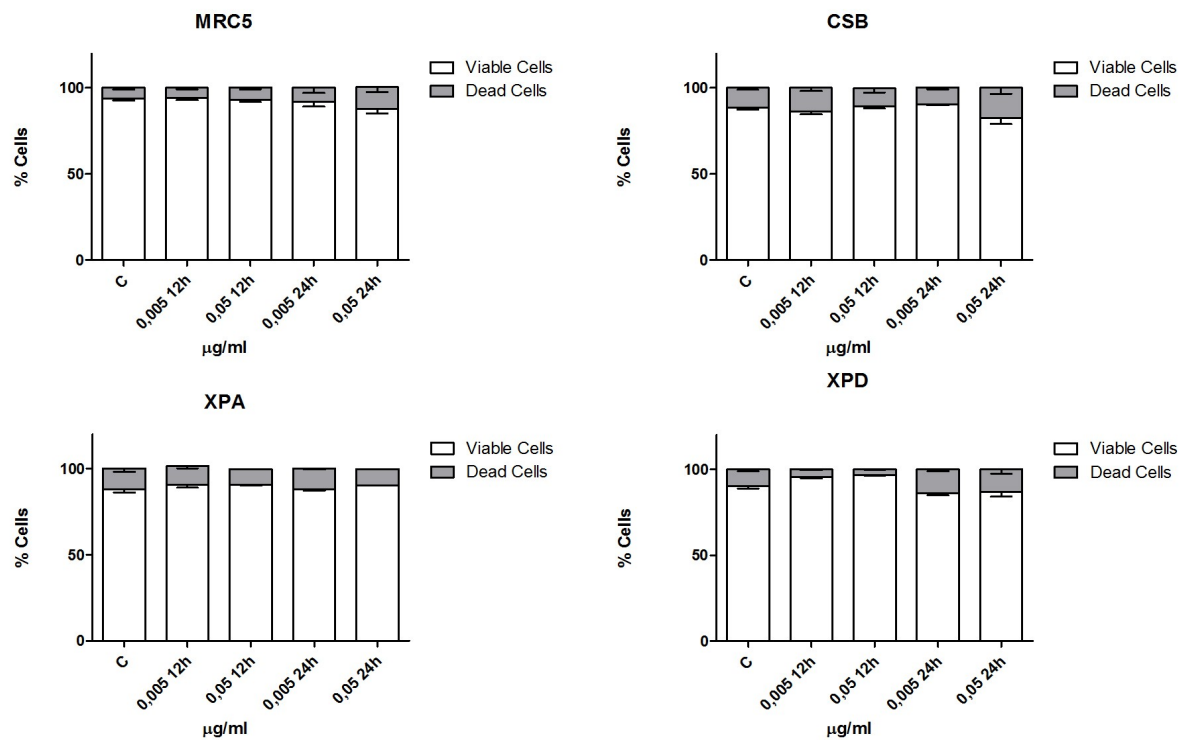


Figure 1. Annexin V - FITC by flow cytometry. After 12h and 24h of treatment with DOX cells are incubated with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. C: Negative control.

Figura 2A

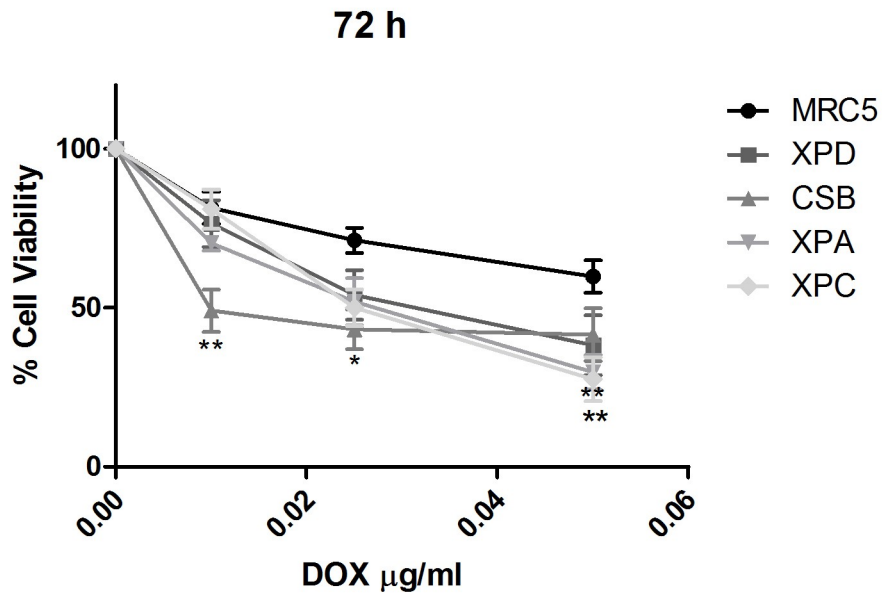


Figure 2A. DNA repair deficient and proficient cell sensitivity to DOX. Cells were exposed to the indicated doses of DOX for 72 h and cell viability assessed by MTT assay . Statistical analysis was applied for comparing DNA repair proficient (MRC5) with DNA repair deficient (CSB, XPA, XPC and XPD) cells. Results are expressed as percentage of control growth for each data point and represent the mean (\pm standard error) of three independent experiments.

Figura 2B

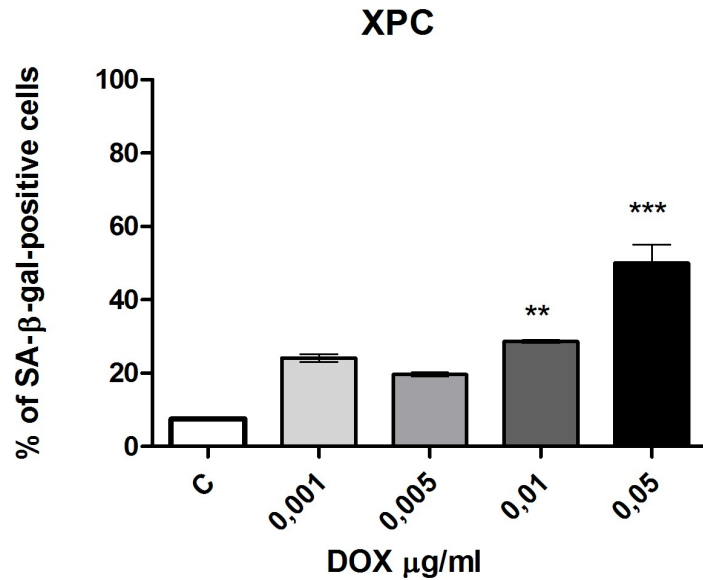


Figure 2B. Induction of senescence in XPC deficient cells by DOX. Cells were treated with indicated doses of DOX for 72h, followed by two washes for drug removal. Then cells were grown for 7 days in drug-free DMEM and analyzed by SA-beta-gal assay.

Figure 3

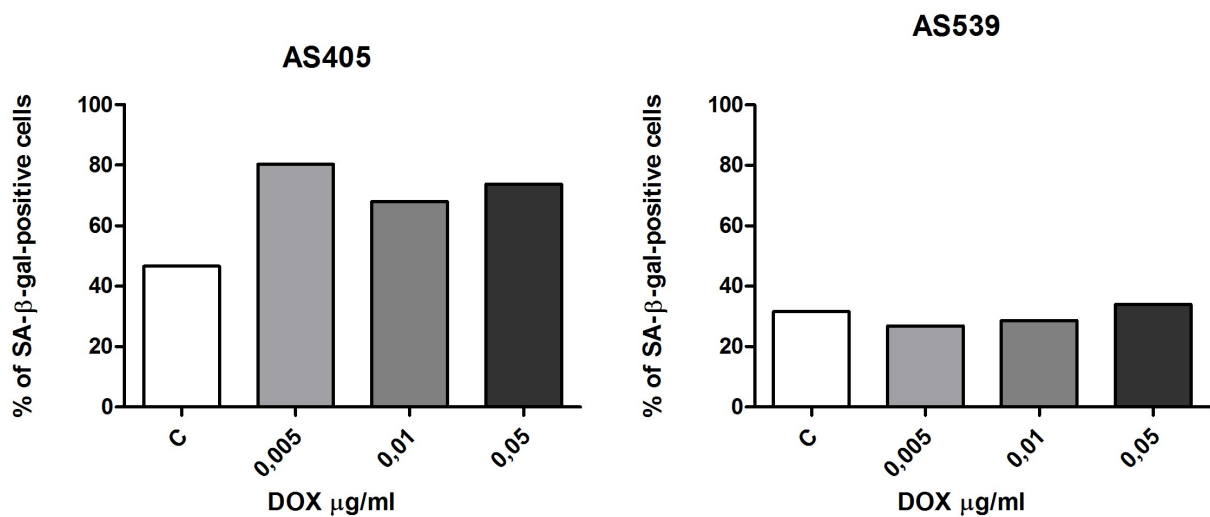


Figure 3. Induction of senescence in CSB deficient primary cells by DOX. Cells were treated with indicated doses of DOX for 72h, followed by two washes for drug removal. Then cells were grown for 7 days in drug-free DMEM and analyzed by SA-beta-gal assay.

Figura 4

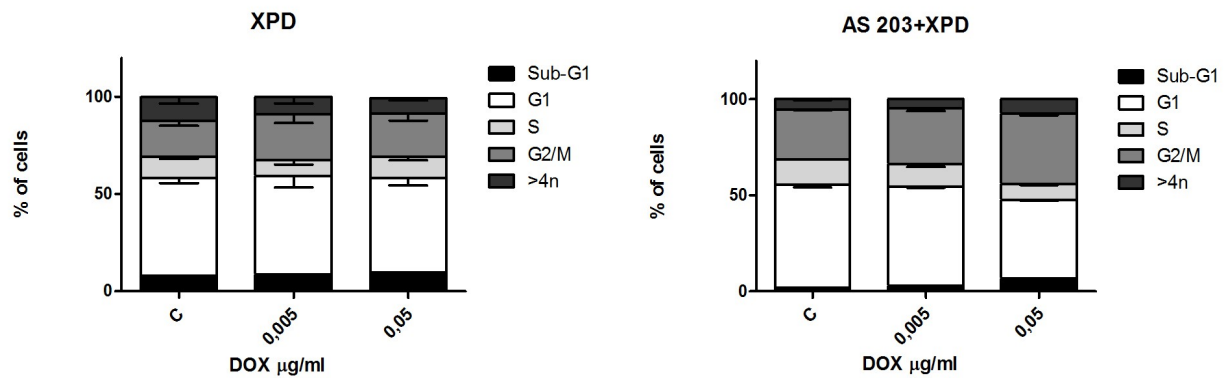


Figure 4. Cell cycle analysis after DOX treatment. XPD and AS203+XPD cells were treated with indicated doses of DOX and analyzed for cell cycle distribution after 72h. Each value represents the mean (\pm standard error) of three individual experiments. *Significantly different in relation to the MRC5 cells at the same concentration, $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figura 5

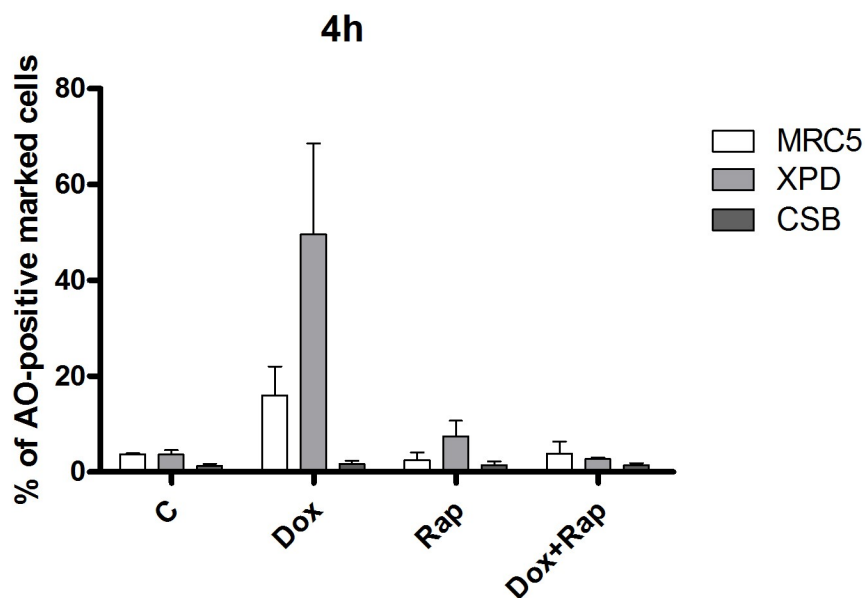
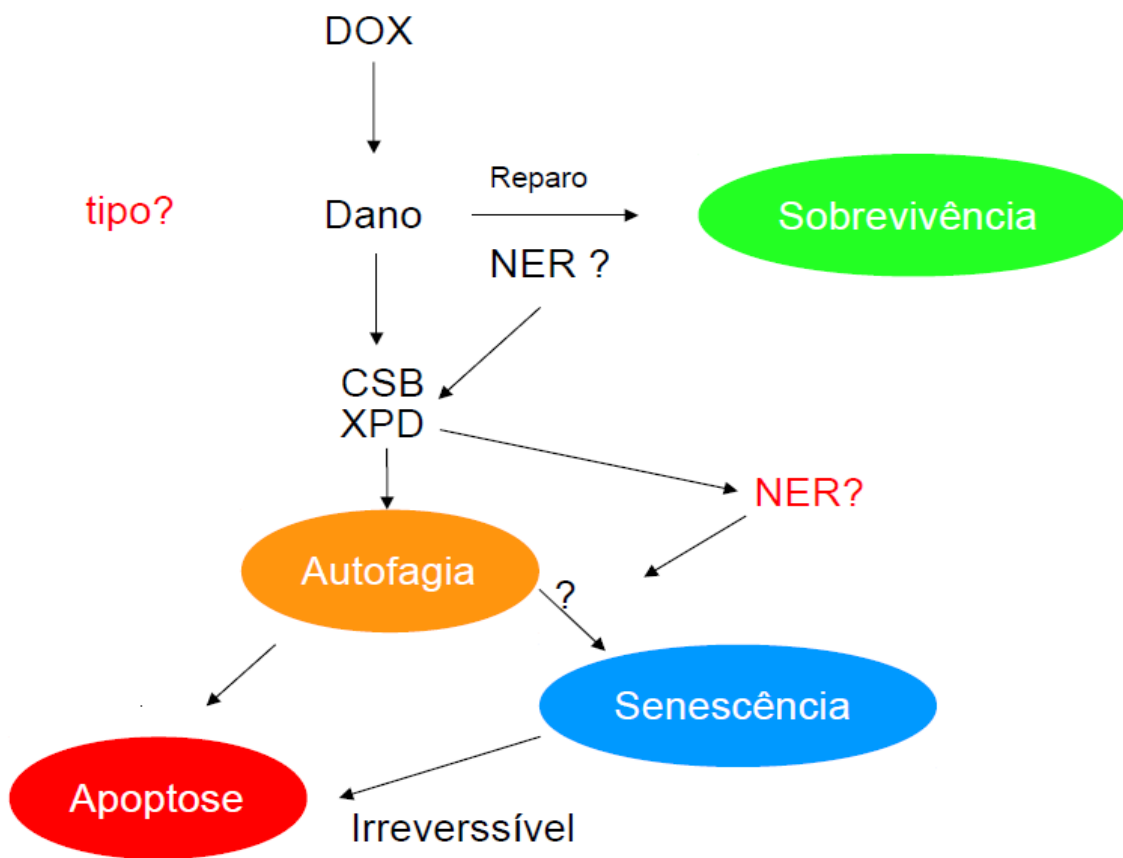


Figure 5. Autophagy induction by DOX. Cells were treated with DOX 0,05 µg/ml for 4h,

followed by acridine orange (AO) staining and flow cytometry. Percentage of cells with positive red fluorescence as analyzed by flow cytometry. SEM of three independent experiments. C-Control; Dox-Doxorubicin; Rap-Rapamycin; Dox+Rap-Co-treatment Doxorubicin and Rapamycin.

Figura 6.

a)



b)

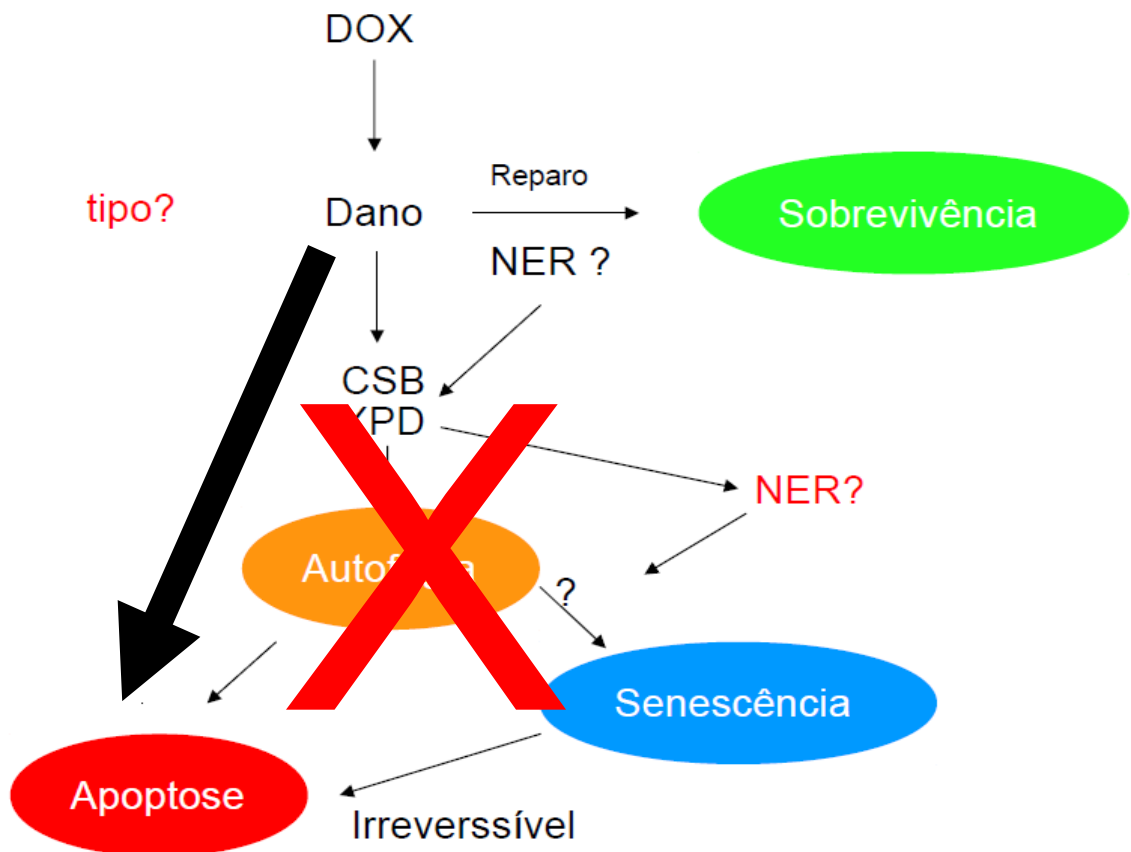


Figura 6. Vias de apoptose, autofagia e senescência desencadeadas por dano induzido no DNA pela DOX. a) DOX leva a danos no DNA que são reparados pelas proteínas do NER, estas desencadeiam autofagia e senescência para os quais CSB e XPD parecem ser necessárias. b) Danos induzidos pela DOX também desencadeiam apoptose, que é atenuada pela autofagia e aumenta quando a autofagia está bloqueada. A inibição da autofagia seguida da DOX também leva a atenuação da senescência, e se esta for irreversível as células podem acabar morrendo por apoptose.

Larissa Milano de Souza

Endereço: Lima e Silva, 152/803B
Telefone: 51 32399810/ 51 98548294
E-mail: milano.lari@gmail.com
Data de nascimento: 01.04.1988
Estado Civil: Solteira

Formação Acadêmica

- Doutorado em Biologia Celular e Molecular
PPGBCM/UFRGS Em andamento, previsão de conclusão 2017.
- Mestrado acadêmico em Biologia Celular e Molecular
PPGBCM/UFRGS
- Graduação em Biomedicina
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.
- Graduação em Tecnologia em Marketing Internacional
Faculdade de Tecnologia TECBrasil, FTEC.
Interrompida em 2007

Experiência

- Curso de Férias: Você conhece a Célula?
PPGBCM/UFRGS
Monitoria - 2013
- SIDI Medicina por Imagem
Tomografia computadorizada e Ressonância magnética nuclear
Processamento e reconstrução de Imagens - 2011 até 2012
- Laboratório de Reparo de DNA de Eucariotos
Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia- UFRGS
Bolsista Iniciação Científica, CNPq - 2008 até 2012
- Laboratório de Neuroquímica & Neurofisiologia da Memória
Centro de Pesquisa em Memória - PUC/RS
Bolsista de Iniciação Científica Voluntária – 2010 até julho de 2011

- Laboratório de Imunologia de Transplantes – Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - SCM
Estagiária Voluntária – 2008 até 2009
- Laboratório de Genética Toxicológica – ULBRA
Bolsista de Iniciação Científica Voluntária – 2007 até 2008
- Universidade Luterana do Brasil, ULBRA – Curso de Biomedicina
Monitora Voluntária das disciplinas: Métodos de análises em Laboratório de Análises Clínicas I e II – 2008

Prêmios e títulos

Título - Mestre em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. 2014

Awards for young scientists - XVII ALEXANDER HOLLAENDER COURSE/ Uruguay, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)/ XVII AHC. 2012

Destaque do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS -apresentação oral e pôster, PROPEQS/UFRGS. 2011

Título - Bacharel em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. 2011

Idiomas

Alemão - Básico

Espanhol - Básico

Inglês – Intermediário

Qualificações

Extensões Universitárias:

Extensão universitária em Estudo da Sinalização celular do Câncer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 2011

Extensão universitária em Diversidade viral:Porque os vírus emergem e mutam.
Universidade Feevale - 2009

Reparo no DNA:mecanismos e formas de estudo.Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental - 2009

Extensão universitária em Células-Tronco Mesenquimais Curso teórico prático.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 2008

Extensão universitária em Genética na UFRGS: pesquisa ensino ao alcance todos.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 2008

Extensão universitária em Ferramentas de Bioinformática no desenvolvimento de vacinas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 2008

Extensão universitária em Interpretações laboratoriais na toxicologia clínica.
Congresso Sul de Toxicologia Clínica Laboratorial – Toxsul - 2008

Extensão universitária em Percepção de Risco em Laboratório Clínico.
Universidade Luterana do Brasil – 2007

Extensão universitária em Cuidados no Manejo de Animais de Laboratório.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Participação em eventos:

11th International Conference on Environmental Mutagens, Foz do Iguaçu, Brasil – 2013

Workshop Mathematical Modeling of the DNA Damage Response, Guildford, UK – 2013

FEBS DNA Repair Workshop, Smolenice Castle, Slovakia – 2013

V FARM – DNA Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, São Paulo, Brasil – 2013

10th International Congress on Cell Biology, Rio de Janeiro, Brasil, 2012

IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, Porto Alegre, Brasil, 2012

XVII Alexander Hollaender Course, Montevideo, Uruguay – 2012

IV Semana Acadêmica da UFCSPA e I Tecnologia e Inovação, Porto Alegre, Brasil - 2011

XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS – 2011

XIII Reunião do PPGBCM – 2011

Annual Meetings SFFRR Europe, and EEMS, Oslo, Norway, 2010

XIV Congresso Latino Americano de Genética.Viña del Mar/Chile – 2010

I Simpósio dos programas de pós-graduação da UFCSPA e I Mostra Científica dos Programas de Pós-Graduação em Saúde – 2010

IV Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS – 2010

XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS – 2010

8th International Comet Assay Workshop, Firenze, Italy - 2009

II Congresso Internacional de Bioanálises, V Congresso Sul-brasileiro de Biomedicina e IX Semana Gaúcha de Biomedicina , Feevale– 2009

IX Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, UFMG - Ouro Preto/MG – 2009

V Jornada Acadêmica do Curso de Biomedicina e I Simpósio sobre Habilitações da Biomedicina da UFCSPA - 2009

II Ciclo de Palestras em Imunologia: Um olhar sobre a Imunoterapia – 2009

XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS – 2009

III Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS – 2009

Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial – Toxsul – Porto Alegre/RS– 2008

XIV Salão de Iniciação Científica da ULBRA - 2008

V Jornada Acadêmica do Curso de Biomedicina ULBRA – 2008

II Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS – 2008

X Reunião do PPGBCM/UFRGS - 2008

IV Jornada Acadêmica de Biomedicina ULBRA – 2007

Produção Bibliográfica/Apresentações de Trabalho

Milano, L. ; Lopes, S.; Guecheva T. ; Lenz, G. ; Saffi, Jenifer. Doxorubicin cytotoxicity and autophagy in DNA repair deficient cells. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Guecheva T. ; Lenz, G. ; Saffi, Jenifer. Cytotoxic effects of

anthracyclinnes in human fibroblasts deficient in NER. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Guecheva T. ; Fillippi-Chiela, E. ;Lenz, G, ; Saffi, Jenifer. The NMA as a tool for evaluation of senescence in human fibroblasts deficient in NER. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Lopes, S.; Guecheva T. ; Lenz, G, ; Saffi, Jenifer. Doxorubicin cytotoxicity and autophagy in DNA repair deficient cells. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Guescheva T. ; Agnolletto, M. ; Menck, C. ; Henriques J.A.P. ; Saffi, Jenifer . Repair kinetics and oxidative damage induction in NER-deficient human fibroblasts treated with Doxorubicin. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Cinética de Reparo e Indução de Dano Oxidativo pela Doxorubicina em Fibroblastos Humanos Deficientes em Reparo por Excisão de Nucleotídeos. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Guescheva T. ; Milano, L. ; Agnoletto, M. ; Henriques J.A.P. ; Menck, C. ; Sarasin, A. ; Saffi, Jenifer . The role of oxidative damage and DNA adducts formation on the doxorubicin induced cytotoxicity in NER-deficient human fibroblasts. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Milano, L. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Danos oxidativos e estudo do reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) na indução de lesões induzidas pela doxorubicina em fibroblastos humanos. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SOUZA, L. M. ; Viau C. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer ; Henriques J.A.P. . Induction of Fpg and Endo III Sensitive Sites in V79 Fibroblasts by Stannous Chloride. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Milano, L. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Indução de danos oxidativos no DNA de células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos tratadas com Doxorubicina. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Milano, L. ; Agnolletto, M. ; Guescheva T. ; Batista L. Z., ; Henriques J.A.P. ; Menck, C. ; Saffi, Jenifer . The role of oxidative damage on the doxorubicin induced cytotoxicity in XPD-deficient fibroblasts. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Milano, L. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . INDUÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS NO DNA DE CÉLULAS DEFICIENTES EM REPARO POR EXCIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS TRATADAS COM DOXORRUBICINA. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SOUZA, L. M.; Saffi, Jenifer ; O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-frequência sobre o peso de ratos neonatos.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SOUZA, L. M. ; Saffi, Jenifer ; Borba, Juliana ; Furtado, Orlando . AÇÃO INIBIDORA DO EXTRATO DAS FLORES DE *H. tiliaceus* L. SOBRE STRESS OXIDATIVO CAUSADO POR CAMPO ELETROMAGNÉTICO DE ULTRA-ALTA-FREQÜÊNCIA 2008 (14º Encontro Nacional de Química Analítica/João Pessoa – PB).