

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Avaliação da atividade citotóxica de 5-fluorouracil e seu
metabólito FdUMP, e os sistemas de reparo envolvidos**

Dissertação de Mestrado

Renata Matuo

Porto Alegre
2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular

Avaliação da atividade citotóxica de 5-fluorouracil e seu metabólito FdUMP, e os sistemas de reparo envolvidos

Renata Matuo

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pegas Henriques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Porto Alegre, março de 2008

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi financiado pela Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Laboratório de Genotoxicidade GENOTOX-Royal

Dedico este trabalho a minha família, pelo apoio incondicional, e ao Fabrício, por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e irmã, por apoiar minhas escolhas, pelos conselhos e incentivos em momentos difíceis, e que mesmo longe, sempre estiveram comigo.

Ao Fabrício, namorado e amigo, por estar sempre ao meu lado e não me deixar desistir dos meus sonhos. Obrigada pelas inúmeras colaborações nos momentos em que precisei me ausentar do laboratório.

Ao Prof. Henriques pela oportunidade de desenvolver este projeto, confiança, amizade e principalmente pela compreensão em vários momentos difíceis. Muito obrigada pelo apoio e incentivo na fase final deste mestrado e pela orientação durante estes dois anos que me permitiu amadurecer cientificamente!

À Profa Jenifer Saffi, por ter me aberto as portas do seu grupo de pesquisa e pela orientação. Agradeço por todas as contribuições como co-orientadora e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Dr. Alexandre Escargueil pela orientação, sugestões, ajuda na redação dos papers e discussão de resultados, sempre muito paciente e com boas idéias, com quem aprendi muito sobre ciência.

À Profa. Ivana Grivicich pelas colaborações e sugestões para o projeto, sempre disposta a ajudar com protocolos, idéias, reagentes e linhagens celulares.

Aos colegas de bancada, Jacqueline Cardone, Cassiana, Lavínia, Fernanda, Orlando e Juliana pela ótima convivência, carinho, incentivo e confiança. Agradeço a Jacque especialmente pela ajuda na redação de projetos e revisão de artigos, à Cassiana pelos conselhos e pelas palavras certas em momentos complicados e à Lavínia pela amizade e companheirismo além do laboratório.

Aos amigos do laboratório 219 que não estão mais presentes, Renata Medina, Bacana e Nusha, que me receberam muito bem no laboratório, pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório 218, Irina e Juliana, pela amizade e companheirismo durante estes dois anos.

Aos colegas dos laboratórios 210, Dinara, Renato, Albanin, Iuri, Ana Catarina, Fernanda, Jacque e Cláudio e do Genotox, Miriana, Izabel, Miriam e Jacqueline, pela amizade e colaborações.

À Dra. Daniele Soares pela ajuda com os experimentos de leveduras.

Aos técnicos do Centro de Biotecnologia, Milton e Paulo, pelo cuidado com os nossos materiais.

À Márcia Vaz, pela ajuda essencial com as burocracias do mestrado e do laboratório.

Aos secretários do Programa de Pós Graduação, Elmo e a Ellen, pela ajuda com as questões burocráticas.

À Profa. Kátia Kvitko pela orientação na disciplina de estágio supervisionado e por sempre estar disposta a ajudar.

À Profa. Fabiana Horn e suas alunas Nicole, Letícia e Mauren pelo auxílio com os experimentos de caspase.

A todos os professores dos Departamentos de Genética, Biofísica e Biotecnologia que contribuíram para minha formação.

Aos colegas que permaneceram em Londrina e que ainda mantenho contato, pela amizade.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Kátia Kvitko, Prof. Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão e Profa. Dra. Mirian Salvador, pelas contribuições na dissertação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii

I. INTRODUÇÃO

1. Introdução geral.....	15
1.1. 5-Fluorouracil.....	16
1.2. Ensaio de mutagenicidade em células de mamíferos.....	19
1.2.1. Ensaio do cometa.....	20
1.2.2. Ensaio de micronúcleo.....	22
1.3. Ensaio de mutagenicidade e reparo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.4. Vias de reparação de DNA.....	25
1.4.1. Reparação por excisão de bases.....	26
1.4.2. Reparação por excisão de nucleotídeos.....	29
1.4.3. Reparação pela recombinação homóloga.....	34
1.4.4. Reparação pela recombinação não-homóloga.....	36
1.4.5. Reparação por síntese translesão.....	38
1.4.6. Reparação de bases mal-emparelhadas.....	40

II. OBJETIVOS.....	44
--------------------	----

CAPÍTULO I	45
“5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line”	
CAPÍTULO II	69
“Involvement of Base excision repair pathway in repairing lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP”	
III. DISCUSSÃO	87
IV. CONCLUSÃO	95
V. PERSPECTIVAS	97
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
6-4PP	Fotoadutos 6-4-pirimidina pirimidona
BER	Reparação por excisão de bases
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DSBs	Quebras de fita dupla no DNA
dNTPs	Nucleotídeos trifosfatados
dTMP	2'-deoxitimidina-5'-monofosfato
dTTP	2'-deoxitimidina-5'-trifosfato
dUMP	2'-deoksiuridina-5'-monofosfato
dTTP	2'-deoksiuridina-5'-trifosfato
FdUMP	5-fluoro-2'-deoksiuridina-5'-monofosfato
GGR	Reparação global do genoma
HR	Reparação pela recombinação homóloga
NER	Reparação por excisão de nucleotídeos
NHEJ	Reparação pela recombinação não-homóloga ou ilegítima
MMR	Reparação de bases mal-emparelhadas
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
SSBs	Quebras de fita simples no DNA
ssDNA	DNA de fita simples
TCR	Reparação acoplada à transcrição
TLS	Reparação por síntese translesão
TK	Timidina cinase
TS	Timidilato sintase
UVC	Radiação Ultravioleta curta (254 nm)

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1: Estrutura do uracil e 5-fluorouracil (5-FU). Adaptado de Grem (1997).	16
Figura 2: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa. Adaptado de Collins (2004).	22
Figura 3: Diagrama da reparação por excisão de bases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Em linhagens selvagens, a reparação por BER ocorre preferencialmente via AP endonuclease (Apn1), DNA polimerase (Polε), 5'-flap endonuclease (Rad27) e uma DNA ligase (Cdc9) (Parte esquerda). Uma fração menor de sítios AP é clivada por AP liases (Ntg1, Ntg2 ou Ogg1), seguida pela Apn1 ou Apn2. Uma forma alternativa é a clivagem por Rad1-Rad10 endonuclease (Parte Direita). Adaptado de Boiteux & Guillet (2004).	28
Figura 4: Origem, reparo e conseqüências biológicas de sítios AP no DNA. Os sítios AP, intermediários no BER, podem ser formados pela hidrólise espontânea, excisão de bases normais, inapropriadas ou contendo lesões, pelas DNA glicosilases. Estes sítios podem ser reparados por vias livres de erro, como a reparação por excisão de bases, excisão de nucleotídeos e HR; tolerados por uma via mutagênica como a reparação por síntese translesão; ou se não reparados, podem levar a morte celular. Adaptado de Boiteux & Guillet (2004).	29
Figura 5: Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos em células de mamíferos. O dano é reconhecido e o complexo de reparação é recrutado. O reparo procede pela ação de helicases, seguido pela incisão nos dois lados da lesão, e posterior liberação de um fragmento de 24-32 nucleotídeos. O espaço resultante é preenchido pela polimerase, com posterior religação das extremidades. Adaptado de Berstein <i>et al.</i> (2002).	30
Figura 6: Reparação por excisão de nucleotídeos em células de mamíferos. O reconhecimento do dano é diferente para GGR e TCR, porém, o processamento da lesão requer as mesmas proteínas. Adaptado de van Hoffen <i>et al.</i> (2003).	33
Figura 7: Diagrama do reparo pela recombinação homóloga. As extremidades livres de DNA que são formadas próximas a DSB são reconhecidas e processadas. O filamento de DNA danificado parecia-se com a fita homóloga, a qual serve de molde para síntese de DNA. Adaptado de Brugmans <i>et al.</i> (2007).	35
Figura 8: Reparação pela recombinação não-homóloga. A DSB é reconhecida, as extremidades de DNA são processadas, e posteriormente religadas. Adaptado de Brugmans <i>et al.</i> , 2007.	37
Figura 9: Reparação por síntese translesão em leveduras. O quadrado vermelho representa uma lesão de DNA não codificante. (A) As polimerases replicativas, polδ e polε, são responsáveis pela replicação do DNA genômico, porém não são capazes de ultrapassar lesões e param a replicação. (B) Perante a parada da forquilha de replicação, o complexo ubiquitina – PCNA dissocia as polimerases de replicação e recruta polimerases que são capazes de ultrapassar lesões: pol zeta (Rev3-Rev7) associadas a Rev1. (C) Rev3-Rev7 ou possivelmente Rev1, insere um nucleotídeo no	39

<p>filamento oposto ao que contém a lesão, e pol zeta realiza a extensão. (D) Após ultrapassar a lesão, o complexo envolvendo Rev3-Rev7 e Rev1 é dissociado e as polimerases de replicação são re-associadas, dando continuidade a síntese de DNA. Adaptado de Gan <i>et al.</i> (2008).</p>	
<p>Figura 10: Reparação por MMR em <i>E. coli</i>. A fita de DNA recém sintetizada (verde) não apresenta padrão de metilação nos sítios GATC. A base mal-emparelhada (triângulo vermelho) ativa um complexo MutS-MutL-ATP. MutH endonuclease cliva a fita próximo a seqüência GATC não metilada. A UvrD helicase, junto com outras exonucleases, geram um fragmento de aproximadamente 100 nucleotídeos, o qual é posteriormente preenchido pela pol III e selado pela DNA ligase. Adaptado de Jiricny (2006).</p>	42
<p>Figura 11: Processos que sucedem após o DNA ser danificado: Parada de ciclo celular e reparação, indução de apoptose ou carcinogênese. Adaptado de Berstein <i>et al.</i> (2002).</p>	88
<p>Figura 12: Participação das vias de reparação de DNA nos danos gerados por 5-FU e FdUMP. O 5-FU pode ser convertido a fluoronucleotídeos (FdU) ou metabolizado em FdUMP. O FdUMP por sua vez, leva a inibição da TS e conseqüentemente ocorre o desbalanço do <i>pool</i> de nucleotídeos. <u>Coluna A:</u> Tanto FdU como uracil podem ser incorporados no DNA após tratamento com 5-FU. Dependendo do tipo de pareamento, as bases errôneas serão reparadas por diferentes maquinarias: BER reconhece FdU:A e U:A, enquanto que FdU:G é reconhecido pelo MMR. Falhas nestes processos desencadeiam SSBs e DSBs. As DSBs, por sua vez, podem ser reparadas por HR. <u>Coluna B:</u> O FdUMP levaria a incorporação de uracil no DNA, que é reparado preferencialmente por BER. Falhas no BER levariam a formação do SSBs.</p>	95

RESUMO

O 5-fluorouracil (5-FU) é um antineoplásico análogo pirimídico empregado no tratamento de muitos tipos de cânceres. Três diferentes mecanismos de citotoxicidade são atribuídos a este agente: incorporação de fluoronucleotídeos no DNA ou RNA e a inibição da enzima timidilato sintase. O 5-FU pode ser convertido ao seu metabólito ativo, o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), que por sua vez, pode inibir a enzima timidilato sintase (TS), responsável pela síntese de timidina monofosfato a partir de uridina monofosfato; a inibição de TS leva ao desbalanço do *pool* de nucleotídeos, diminuindo a concentração de dTTP, aumentando a de dUTP e, como consequência, levando à incorporação de uracil na cadeia de DNA.

No presente estudo comparamos a atividade citotóxica de 5-FU e de seu metabólito FdUMP e as vias de reparação de DNA envolvidas na eliminação das lesões induzidas por estas substâncias. A atividade citotóxica foi avaliada em células de adenocarcinoma de cólon humano, linhagem SW620. As vias de reparação foram estudadas em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em genes de reparo para excisão de bases (BER), excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR), recombinação não-homóloga (NHEJ) e síntese translesão (TLS). Para se investigar a possível sobreposição das vias de reparo, foram empregados quádruplos mutantes em BER e NER, HR ou TLS.

Os resultados em células tumorais humanas mostraram que tanto 5-FU, quanto FdUMP desencadeiam morte celular por apoptose. Ao avaliar a progressão do ciclo celular, observou-se que 5-FU leva a parada em G1, enquanto que FdUMP, parada em G2. Com a finalidade de se investigar se estas paradas de ciclo celular estariam relacionadas a quebras de DNA, foram empregados ensaios de fosforilação da histona H2AX e os testes de cometa alcalino e de micronúcleos. Observou-se que ambas as drogas induzem fragmentação no DNA, uma vez que foram observadas quebras de fita simples e formação de micronúcleos. Logo, a diferença na progressão do ciclo celular não está relacionada com a habilidade das drogas em induzir quebras. Desta forma, sugere-se que o efeito diferencial de 5-FU e FdUMP na progressão do ciclo celular depende do tipo de lesão induzida pelas drogas e as vias de reparação de DNA implicadas no reconhecimento das mesmas.

Ao empregar linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em reparo tratadas com 5-FU e FdUMP, observou-se que a proteína Apn1 é de extrema importância no reparo das mesmas, uma vez que *apn1Δ* foi o mais sensível de todos os mutantes e *ntg1Δntg2Δapn1Δ* apresentou grande sensibilidade aos tratamentos com ambas as drogas. As lesões causadas por 5-FU seriam reconhecidas principalmente pela Ntg2, o que resulta em significativa sensibilidade em *ntg2Δ* e *ntg1Δntg2Δ*. Entretanto, para o reconhecimento dos danos por FdUMP são necessárias a participação tanto de Ntg1 quanto Ntg2, como visto na elevada sensibilidade do duplo mutante *ntg1Δntg2Δ*. As deficiências em Ung1 e Rad27 não revelaram diferenças significativas em relação às linhagens selvagens, bem como nos mutantes em NER (*rad1Δ* e *rad10Δ*), HR (*rad52Δ*), NHEJ (*rad50Δ*) e TLS (*rev1Δ* e *rev3Δ*), para ambas as drogas.

No emprego de quádruplos mutantes, verificou-se que *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* mostrou uma acentuada sensibilidade quando tratado com 5-FU. Estes resultados sugerem que os danos gerados por 5-FU poderiam ser reconhecidos e removidos pela DNA glicosilase Ntg2 e AP endonucleases Apn1 do BER, levando a quebras de fita simples e dupla de DNA, que seriam reparadas por HR (Tipo RAD52). Entretanto, para o tratamento com FdUMP não foram observadas diferenças significativas quando comparado com a linhagem selvagem. Ao analisar a sensibilidade dos mutantes *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ*, verificou-se que os mesmos não foram sensíveis ao tratamento com FdUMP, entretanto apresentaram moderada sensibilidade quando tratados com 5-FU. O conjunto desses resultados nos leva a sugerir que uma pequena parte dos sítios AP produzidos pelo tratamento com 5-FU poderia ser processada por NER e TLS, sendo a participação de HR a mais importante. As lesões geradas por FdUMP seriam reparadas principalmente por BER, com a participação de Ntg1, Ntg2 e Apn1, porém não pode ser descartado o possível envolvimento da reparação de bases mal-emparelhadas - MMR, uma vez que se observou previamente, uma parada no ciclo celular em G2 em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620.

ABSTRACT

5-fluorouracil (5-FU) is an antineoplastic drug pyrimidic analogue employed in the treatment of several cancers. Three different mechanisms of cytotoxicity are attributed to this agent: misincorporation of fluoronucleotides in DNA or RNA and inhibition of thymidilate sintase enzyme. 5-FU could be converted to its active metabolite, 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), that could inhibit the thymidilate sintase (TS), related to thymidine synthesis from uridine; TS inhibition leads to nucleotide pool imbalance, decreasing thymine concentration and increasing uracil, as consequence, it leads to uracil incorporation into DNA.

The present study compared the cytotoxic activity of 5-FU and its active metabolite FdUMP, and the DNA repair pathways involved in removing lesions induced by these substances. Cytotoxicity was evaluated in human colon adenocarcinoma cells, SW620. DNA repair pathways were studied in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ) and translesion synthesis (TLS). To investigate the overlapping of DNA repair pathways, we employed quadruple mutants in BER and NER, HR or TLS.

Results in human tumor cells showed that both 5-FU and FdUMP induce cell death by apoptosis. When we investigated the cell cycle progression, we observed that 5-FU lead G1 arrest, while FdUMP induced G2 arrest. In order to investigate if these arrests would be related to DNA breaks, alkaline comet assay, fosforilation of H2AX histone and micronucleus assay were employed. We observed that both drugs induce DNA fragmentation, since single strand breaks and micronucleus were evidenced. Thus, the difference in cell cycle progression is not related to the ability of 5-FU and FdUMP in induce breaks. This way, we suggest that the differential effect of 5-FU and FdUMP in cell cycle progression depends on the type of lesion originated by drugs and the DNA repair pathways implicated in recognize them.

By employing *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in DNA repair treated with 5-FU and FdUMP, it was observed that Apn1 protein is extremely important in repairing these lesions, since *apn1Δ* was the most sensitive of all mutants employed and

ntg1Δntg2Δapn1Δ showed high sensitivity to treatments with both drugs. Lesions caused by 5-FU would be recognized mainly by Ntg2, what results in significant sensitivity in *ntg2Δ* and *ntg1Δntg2Δ*. However, for recognition of FdUMP damage it is necessary the participation of both *Ntg1* and *Ntg2*, as observed in high sensitivity of *ntg1Δntg2Δ* double mutant. Deficiencies in Ung1 and Rad27 did not reveal significant differences in relation to WT, as well as mutants in NER (*rad1Δ* e *rad10Δ*), HR (*rad52Δ*), NHEJ (*rad50Δ*) e TLS (*rev1Δ* e *rev3Δ*), for both drugs.

When we employed quadruple mutants, we verified that *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* showed higher sensitivity when treated with 5-FU. These data suggest that damage generated by 5-FU could be recognized and removed by DNA glycosylases Ntg2 and AP endonuclease Apn1 from BER, generating DNA single and double strand breaks, that could be repaired by HR (*RAD52* Type). However, for FdUMP, we did not observe significant differences in comparison to WT. By investigating the sensitivity of *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ*, we observed that they were not sensitized by FdUMP, however, they present a slight sensitivity when treated with 5-FU. These results lead us to suggest that a small part of AP sites generated by 5-FU could be processed by NER and TLS, and HR would be the most significant. Lesions by FdUMP would be repaired mainly by BER, with participation of Ntg1, Ntg2 and Apn1, however, we can not discharge the possible involvement of mismatch repair pathway - MMR, since we previous observed G2 arrest in SW620 human colon adenocarcinoma cells.

I. INTRODUÇÃO

1. Introdução Geral

Os quimioterápicos empregados no tratamento de neoplasias, de maneira geral, apresentam atividade citotóxica. Estes agentes podem ser classificados como: (i) agentes alquilantes, (ii) antimetabólitos, (iii) inibidores de topoisomerases e (iv) alcalóides da vinca e compostos relacionados (Rang *et al.*, 1997; Cunha e Lehmann, 2003).

Os agentes alquilantes são compostos que reagem com o DNA, substituindo um átomo de hidrogênio por um grupamento alquila, e como consequência, formam ligações covalentes com o DNA, mais especificamente com as bases guaninas, levando à formação de adutos e de pontes intra e inter-cadeia de DNA, sendo que as últimas impedem a replicação. Os antimetabólitos são compostos que interferem na síntese de precursores de DNA e RNA e, em alguns casos, por apresentarem estruturas semelhantes aos precursores endógenos dos ácidos nucleicos, podem ser metabolizados através das rotas metabólicas utilizadas pelas bases púricas e pirimidicas endógenas. Os inibidores de topoisomerases são agentes que impedem a atividade desta enzima, uma vez que impedem o relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a replicação e transcrição e, como consequência, geram quebras no DNA. Os alcalóides da vinca são de origem vegetal e afetam os microtúbulos, interferindo deste modo na formação do fuso mitótico e levando a aneuploidia (Rang *et al.*, 1997; Cunha e Lehmann, 2003).

1.1. 5-Fluorouracil

O antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) é um antimetabólito análogo pirimídico que tem sido prescrito no tratamento de adenocarcinomas de mama, trato gastrointestinal, ovário, mama, cabeça e pescoço (Grem, 1997; Zúñiga-González *et al.*, 2003; Di Paolo *et al.*, 2004; Longley *et al.*, 2004; Noordhuis *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2006; Seiple *et al.*, 2006). O 5-FU difere do uracil pela substituição de um átomo de hidrogênio no carbono-5 do anel pirimídico por um átomo de flúor (Figura 1). O 5-FU pode entrar nas células por dois mecanismos: difusão facilitada ou não-facilitada. A citotoxicidade desta droga é atribuída a três diferentes mecanismos: incorporação de fluoro trifosfato (FUTP) no RNA; incorporação de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA genômico e inibição da enzima timidilato sintase relacionada à síntese de nucleotídeos (Grem, 1997; Longley *et al.*, 2004; Noordhuis *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2005).

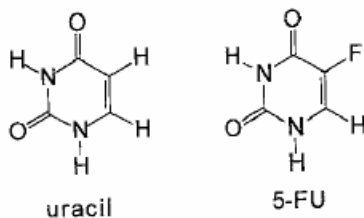


Figura 1: Estrutura do uracil e 5-fluorouracil (5-FU). Adaptado de Grem (1997).

A incorporação de 5-FU no RNA e DNA causa diversos efeitos no metabolismo celular. Os efeitos de incorporação no RNA são: diminuição da sua síntese; inibição da poliadenilação de RNA mensageiro, diminuindo sua estabilidade; alteração da sua estrutura secundária; mudanças quantitativas e qualitativas na síntese protéica; incorporação de uracil nas snRNA, interferindo no *splicing* normal (Kufe e Major, 1981; Herrick e Kufe, 1984; Sierakowska *et al.*, 1989; Goshal e Jacob, 1994; Lenz *et al.*, 1994;

Grem, 1997; Noordhuis *et al.*, 2004). Quando incorporado no DNA, o 5-FU inibe sua síntese; interfere com a cadeia de DNA nascente; altera a sua estabilidade e reparo de DNA; induz quebras simples nas fitas nascentes de DNA e quebras duplas no DNA parental (Major *et al.*, 1982; Lönn e Lönn, 1984; Sawyer *et al.*, 1984; Schuetz *et al.*, 1984; Peters *et al.*, 1986; Yin e Rustum, 1991; Grem, 1997; Noordhuis *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2006).

O 5-FU pode ainda ser convertido a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), o qual acredita-se ser o seu principal mecanismo de citotoxicidade (Peters *et al.*, 2002; Di Paolo *et al.*, 2004; Noordhuis *et al.*, 2004; Grivicich *et al.*, 2007). O FdUMP pode se ligar à enzima timidilato sintase (TS) inibindo sua atividade, o que resulta em um desbalanço do *pool* de nucleotídeos, uma vez que a TS tem como função catalisar a síntese *de novo* de timidina monofosfato (dTMP) a partir de uridina monofosfato (dUMP). Desta maneira, há o aumento considerável da concentração intracelular de uracil, o que resulta na incorporação do mesmo no DNA (Grem, 1997; Peters *et al.*, 2002; Noordhuis *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2007; Grivicich *et al.*, 2007).

O estresse genotóxico desencadeado pela inibição da TS pode ativar vias de morte celular programada, resultando em fragmentação do DNA parental. A inibição de TS leva a depleção de 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) e aumento de 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), seguido pela incorporação de uracil no DNA. O desbalanço dos dNTPs induz várias enzimas, como endonucleases, o que resulta em dano no DNA seguido por mudanças em proteínas que atuam na via de apoptose, a qual finalmente leva a célula à morte (Peters *et al.*, 2000a). Além disso, fatores como *bcl-2* e *p53* podem atuar na resposta celular ao estresse genotóxico causado por inibição de TS (Grem, 1997; Nita *et al.*, 1998; Violette *et al.*, 2002).

Os mecanismos de resistência ao 5-FU, tanto adquiridos quanto herdados, estão relacionados à diminuição das enzimas que convertem o 5-FU aos seus metabólitos, a inibição incompleta da TS, à diminuição da incorporação no DNA e RNA e ao aumento dos níveis de diidropirimidina desidrogenase que cataboliza a droga (Di Paolo *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2007). Além disso, altas concentrações de dUTP difosfohidrolase (dUTPase), enzima que evita o acúmulo de dUTP, resulta em menor incorporação no DNA e conseqüentemente, menor citotoxicidade (Ladner, 2001). A expressão de genes envolvidos nas vias de apoptose, tais como *TP53* e *bcl-2*, também pode estar relacionada à resistência aos antineoplásicos (Peters *et al.*, 2000a). A mutação em *TP53* é muito freqüente em diferentes tumores e resulta em alterações na indução normal de apoptose, o que conseqüentemente reduz o efeito antitumoral de muitos agentes anticâncer (Lane, 1992; Lowe *et al.*, 1993; Kastan *et al.*, 1995). A proteína *bcl-2* é um inibidor de apoptose, que mantém a viabilidade celular sem promover a proliferação celular, desta forma, alterações em *bcl-2* podem influenciar a atividade dos antineoplásicos (Korsmeyer, 1995; Kroemer, 1997)

O 5-FU é empregado na clínica em associação com outros antineoplásicos, tais como irinotecan (Saltz *et al.*, 2001; Grivicich *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2005), leucovorin (Peters e van Groeningen, 1991; Cassidy *et al.*, 2006), oxaliplatina (De Gramont *et al.*, 2000; Giachetti *et al.*, 2000), cisplatina e carboplatina (Torres-Bugarín *et al.*, 2004) a fim de se obter sinergismo na citotoxicidade e indução de apoptose (Peters *et al.*, 2000b; Grivicich *et al.*, 2001; Benson e Goldberg, 2003).

Visto que o 5-FU possui atividade citotóxica, vários estudos na área da genética toxicológica tiveram como objetivo avaliar sua atividade mutagênica, empregando diferente sistemas biológicos. O 5-FU foi avaliado pelo teste de *mouse lymphoma assay*

(MLA), no qual foi obtido resultado positivo (Sofuni *et al.*, 1996). Atividade clastogênica também foi evidenciada por Matsushima *et al.* (1999), Oliver *et al.* (2006) e Lorge *et al.* (2006) em testes com células de mamíferos, linhagens CHL/IU, L5178Y e linfócitos humanos, pelo teste de micronúcleo *in vitro*. Resultados positivos quanto à mutagenicidade do 5-FU foram encontrados em teste de mutação reversa em bactérias (Ishidate Jr *et al.*, 1988), aberração cromossômica *in vitro*, (Ishidate Jr *et al.*, 1988; Ohuchida *et al.*, 1991) e micronúcleos *in vivo* (Maier e Schmid, 1976; Ishidate Jr *et al.*, 1988; Mavourin *et al.*, 1990; Ohuchida *et al.*, 1991; Ohuchida *et al.*, 1992; Zúñiga-González *et al.*, 2003).

1.2. Ensaio de mutagenicidade em células de mamíferos

Os testes de mutagenicidade *in vitro* empregando células de mamíferos apresentam inúmeras vantagens, como facilidade de padronização das condições experimentais (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo), aplicabilidade do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, com boa reprodutibilidade. Deve-se ressaltar que o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e a organização dos cromossomos e DNA é a mesma das células *in vivo* (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

O uso de linhagens de adenocarcinoma apresenta boa correlação quando comparado com culturas primárias de tumores. Diversos estudos utilizam diferentes linhagens para avaliar padrões de ciclo celular e inibição de crescimento após tratamento com quimioterápicos (Pizzorno *et al.*, 1995; Tokunaga *et al.*, 2000), marcadores genéticos, cariótipo (Kleivi *et al.*, 2004), entre outros.

Células de carcinoma humano apresentam marcadores que estão relacionados com a sensibilidade ou resistência a quimioterápicos, tais como a proteína p53 e a deficiência na via de reparo de bases mal emparelhadas (MMR), que devem ser considerados quando se pretende estudar a mutagenicidade nestas linhagens. O gene supressor tumoral *TP53* está envolvido no processo de carcinogênese e apresenta mutações em aproximadamente 50% de todos os cânceres humanos (Hofseth *et al.*, 2004). Em resposta a danos no DNA, a proteína p53 regula ciclo celular, reparo de DNA e apoptose, de maneira a manter a integridade do genoma. Mutação em p53 pode levar à resistência a quimioterapia por não induzir a via que leva a apoptose (Peller, 1998; Weller, 1998). O reparo de DNA via MMR consiste em um complexo protéico que reconhece e direciona o reparo de bases nucleotídicas incorretas. Esta via pode participar no reparo de DNA durante a transcrição, meiose e recombinação homóloga. Carethers *et al.* (1999) mostraram que células proficientes em MMR quando tratadas com 5-FU apresentam crescimento mais lento que as deficientes neste mecanismo de reparo.

Para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade em células de mamíferos, diversos ensaios podem ser utilizados, tais como aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, mutação gênica, micronúcleos e cometa, dependendo da finalidade do estudo (Brusick, 1987; Ribeiro *et al.*, 2003). Dentre eles, destacam-se os ensaios do cometa e micronúcleo.

1.2.1. Ensaio do Cometa

O ensaio do Cometa ou “*Single Cell Gel Electrophoresis assay - SCGE*” tem como finalidade identificar lesões genômicas provocadas por agentes genotóxicos, que alteram o

DNA, porém passíveis de reparo (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005). Este teste visa evidenciar a migração de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a um cometa. Esse ensaio vem sendo empregado na avaliação de genotoxicidade de novas drogas, monitoramento ambiental, biomonitoramento humano (Faust *et al.*, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Kumaravel e Jha, 2006; Moller, 2006; Burlinson *et al.*, 2007; Güerci *et al.*, 2007) e pesquisas sobre danos e reparação de DNA (Speit e Hartmann, 1999; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004; Moller, 2006; Burlinson *et al.*, 2007; Collins, 2007; Gaivão *et al.*, 2007; Güerci *et al.*, 2007).

O SCGE apresenta algumas vantagens em relação a demais ensaios citogenéticos, tais como: sensibilidade para detectar danos no DNA, necessidade de somente pequena quantidade de células; as células não precisam estar em divisão; podem ser empregados diferentes tipos celulares e seu custo é relativamente baixo (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Kumaravel e Jha, 2006; Burlinson *et al.*, 2007).

Diferentes versões do teste - alcalina e neutra - podem ser empregadas para se identificar o tipo de lesão: a versão alcalina (pH>13) detecta quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo, sítios abásicos, quebras de fita dupla e ligações cruzadas, enquanto que a versão neutra identifica quebras duplas (Tice *et al.*, 2000; Wojewódzka *et al.*, 2002). Além destas, novos protocolos têm sido utilizados para se detectar adutos no DNA (dímeros de timina, danos oxidativos) ou reparo de DNA (Speit e Hartmann, 1999; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004; Moller, 2006; Burlinson *et al.*, 2007; Collins, 2007; Gaivão *et al.*, 2007; Güerci *et al.*, 2007).

A técnica consiste em submeter as células, embebidas em gel de agarose, a uma eletroforese. O DNA fragmentado, resultado de quebras, migra durante a corrida para fora do núcleo, formando as células com cometa (Collins, 2004; Moller, 2006; Kumaravel *et al.*, 2007). As células são então analisadas e classificadas conforme a extensão da cauda do cometa. Esta análise pode ser feita pela medição do comprimento da cauda com auxílio de uma ocular micrométrica ou por meio de análise visual, classificando as células em diferentes classes (0-4) e obtendo-se um valor arbitrário que expressa o dano geral de uma população (Figura 2) (Hartmann *et al.*, 2003; Kumaravel *et al.*, 2007). Além destas, os danos podem ser quantificados por analisador de imagens. No entanto, o método de classificação visual apresenta alta correlação com análises computadorizadas (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004; Burlinson *et al.*, 2007).

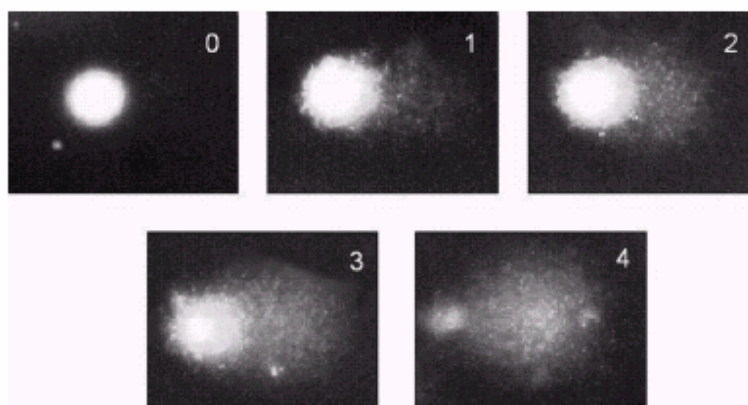


Figura 2: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa. Adaptado de Kumaravel *et al.* (2007).

1.2.2. Ensaio de Micronúcleos

O ensaio de micronúcleo (MN) tem como finalidade identificar substâncias aneugênicas e clastogênicas que não são passíveis de reparo (Fenech, 2000). Este teste é

amplamente utilizado para *screening* de produtos e biomonitoramento (Kirsch-Volders e Fenech, 2001; Fenech, 2006; Iamarcovai *et al.*, 2006; Mateuca *et al.*, 2006), e apresenta vantagens, tais como o uso de baixas concentrações do agente a ser testado e uma análise mais rápida quando comparada com o ensaio de aberrações cromossômicas (Garriot *et al.*, 2002).

O MN pode ser definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, localizado no citoplasma. Pode haver mais de um MN por célula, sendo que estes não devem apresentar conexão estrutural com o núcleo principal. Os fragmentos cromossômicos gerados a partir de quebras, bem como cromossomos inteiros, resultado de disfunções do fuso mitótico, podem formar os MNs (Rabello-Gay *et al.*, 1991; Fenech, 2000; Chung *et al.*, 2002) durante a telófase, uma vez que nesta fase o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas. Desta forma, os MNs são evidenciados apenas em células que completaram um ciclo de divisão celular (Fenech, 1997; Kirsch-Volders e Fenech, 2001; Fenech *et al.*, 2003). Para identificar a origem do MN, se de origem clastogênica ou aneugênica, pode-se empregar em conjunto a técnica de FISH (Fluorescence in situ Hybridization) com marcação centromérica de DNA (Chung *et al.*, 2002; Iamarcovai *et al.*, 2006).

O MN deve apresentar as seguintes características: (i) forma arredondada ou ovalada; (ii) cor e textura semelhantes à do núcleo principal; (iii) estar no mesmo plano do núcleo principal; (iv) não estar ligado ao núcleo principal; (v) apresentar tamanho entre 1/16 e 1/3 do núcleo principal; (vi) não ser birrefringente (Ferrari, 1991; Titenko-Holland *et al.*, 1997; Fenech *et al.*, 2003).

1.3. Ensaio de mutagenicidade e reparo em *Saccharomyces cerevisiae*

A compreensão da biologia de sistemas complexos é facilitada quando os comparamos com organismos mais simples. O uso de organismos unicelulares como as leveduras se mostraram como sistemas ideais para o estudo de mecanismos celulares de eucariotos superiores, uma vez que compartilham similaridades genéticas e bioquímicas (Forsburg, 2001; Armour e Lum, 2005; Mager e Winderickx, 2005), além de apresentarem vantagens como genoma pequeno e crescimento rápido em condições adequadas (Ausubel *et al.*, 1995).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariótico que tem seu genoma totalmente seqüenciado e foi pioneira em experimentos envolvendo transformação com plasmídeos e construção de genes “*knockouts*”. É uma ferramenta útil para estudo de análises genéticas que permitem descobrir novos genes ou compreender melhor os genes já identificados (Forsburg, 2001; Mager e Winderickx, 2005).

O estudo de genes e proteínas em *S. cerevisiae* é facilitado pela simplicidade em se construir linhagens mutantes por disrupção gênica (Mager e Winderickx, 2005). Além disso, os plasmídeos inseridos por transformação podem atuar como moléculas replicativas ou integrados no genoma via recombinação homóloga, substituindo as seqüências de DNA originais (Forsburg, 2001).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido amplamente empregada em estudos da biologia do câncer (Simon *et al.*, 2000; Hartwell, 2002; Kurtz *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005), regulação da divisão celular em eucariotos (Mager e Winderickx, 2005), mecanismos de apoptose (Madeo *et al.*, 2002; Mager e Winderickx, 2005), avaliação de mutagenicidade de compostos ou amostras ambientais (Boeira *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2004) e reparação de

DNA (Simon *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005; Toissaint *et al.*, 2006), além de fins industriais, na produção de alimentos e farmacêutica.

A fim de se estudar os mecanismos de ação de compostos e as vias de reparação de DNA envolvidas após tratamento com mutagênicos, podem ser empregadas linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em determinada via de reparação. Para determinar a natureza das lesões geradas por um determinado agente, compara-se a sensibilidade da droga em mutantes deficientes em uma via de reparo de DNA com a respectiva linhagem isogênica proficiente na via. Caso a linhagem mutante seja mais sensível que a selvagem, pode se inferir que o agente induz o tipo de lesão incapaz de ser reparado pelo mutante (Boeira *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005).

1.4. Vias de reparação de DNA

O DNA pode ser lesionado por inúmeros agentes, tanto endógenos quanto exógenos (Chan *et al.*, 2006; Jagannathan *et al.*, 2006; Krwawicz *et al.*, 2007). Os principais agentes endógenos constituem os radicais livres, derivados do metabolismo do oxigênio, que são capazes de oxidar bases, gerar sítios apurínicos/apirimídicos e quebras de DNA (Aylon e Kupiec, 2004; Chan *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007). Os agentes exógenos são diversos, como a radiação ionizante, que gera quebras de fita dupla no DNA e diferentes químicos, como metilmetanosulfonato e bleomicina, que formam quebras de fita dupla (Dudás e Chovanec, 2004); cisplatina e derivados platinados, que formam adutos e pontes intra e inter cadeia no DNA (Gay *et al.*, 2006); entre outros.

As quebras de DNA, caso não sejam reparadas, podem desencadear sérios problemas como morte celular em organismos unicelulares e cânceres em multicelulares.

Inúmeras doenças humanas relacionadas à reparação de DNA são reportadas: síndrome de Li-Fraumeni, ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, síndrome de Werner, câncer de cólon não poliposo hereditário, Xeroderma pigmentosum (XP), XP com síndrome de DeSanctis-Cacchione, síndrome de Cockayne e tricotiodistrofia (Andressoo e Hoeijmakers, 2005). Tais doenças estão relacionadas à predisposição ao câncer, possível disfunção imune, radiosensibilidade, neurodegeneração e envelhecimento precoce (Hoeijmakers, 2001; Kastan e Bartek, 2004; Andressoo e Hoeijmakers, 2005; Cleaver, 2005; David *et al.*, 2007; Krwawicz *et al.*, 2007; McKinnon e Caldecott, 2007; Rass *et al.*, 2007; Wilson e Bohr, 2007) e são causadas pela deficiência na reparação de SSB e DSB. Como consequência disto, as células eucarióticas desenvolveram diversos mecanismos para reparar estas lesões no DNA. As principais vias são: reparo por excisão de bases (BER) e nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR) e não-homóloga (NHEJ), síntese translesão (TLS) e reparo de bases mal-emparelhadas (MMR).

1.4.1. Reparação por excisão de bases (BER)

O reparo por excisão de bases (BER) pode remover lesões no DNA geradas por danos endógenos tais como desaminação, oxidação e perda de bases (Sung e Demple, 2006), ou ainda uma base errônea incorporada durante replicação e reparo (Almeida e Sobol, 2007; Kavli *et al.*, 2007). A via BER é essencial para a viabilidade e manutenção do DNA (Wood, 1996; Almeida e Sobol, 2007; Hedge *et al.*, 2008), além de ser altamente conservada desde as bactérias até os humanos (Dizdaroglu, 2005).

Nesta via a lesão no DNA é reconhecida por uma enzima DNA glicosilase específica, que hidrolisa a ligação glicosídica da base modificada da cadeia de

desoxirribose-fosfato, gerando um sítio apurínico-apirimídico ou abásico (AP). Este sítio AP então é clivado por uma AP endonuclease ou por uma DNA glicosilase/AP liase, preenchido pela DNA polimerase e as extremidades da fita de DNA seladas pela DNA ligase (Figura 3) (Brozmanová *et al.*, 2001; Boiteux e Guillet, 2004; Dizdaroglu, 2005, Chan *et al.*, 2006; Friedberg *et al.*, 2006; Sung e Demple, 2006; Almeida e Sobol, 2007; Escargueil *et al.*, 2008; Hedge *et al.*, 2008).

As DNA glicosilases diferem-se entre os seus substratos e os mecanismos de reação. Contudo, algumas glicosilases possuem atividade de AP liase, tais como Ogg1 e Ntg1. Após a ação das glicosilases, os sítios AP podem ser processados pela via curta ou longa. A via curta remove apenas 1 nucleotídeo, enquanto que na longa são substituídos de 2 a 13 (Brozmanová *et al.*, 2001; Memisoglu e Samson, 2000; Boiteux e Guillet, 2004; Dizdaroglu, 2005; Jagannathan *et al.*, 2006; Sung e Demple, 2006; Escargueil *et al.*, 2008; Hedge *et al.*, 2008).

Diferentes proteínas são necessárias, para o BER, tais como (i) glicosilases: Ung1, Mag1, Ogg1, Ogg2, Ntg1 e Ntg2; (ii) AP endonucleases: Apn1 e Apn2 e (iii) fatores adicionais, como: Rad27 (flap endonuclease), Pol30 (antígeno nuclear de proliferação celular), Cdc9 (DNA ligase), PolIV, Pol3 e Pol2 (DNA polimerase); todos os genes de *Saccharomyces cerevisiae* citados acima, possuem homólogos em humanos (Memisoglu e Samson, 2000; Boiteux e Guillet, 2004; Dizdaroglu, 2005).

Os sítios AP gerados durante o processo de BER podem ser reparados pelo reparo por excisão de nucleotídeos, tolerados pelo sistema de reparo por síntese translesão ou recombinação homóloga (Swanson *et al.*, 1999; Gellon *et al.*, 2001; Vance e Wilson, 2001; Boiteux e Guillet, 2004; Letavayová *et al.*, 2006) ou se não houver reparo, a célula pode ter sua maquinaria de replicação bloqueada, resultando em morte celular (Figura 4) (Boiteux e

Guillet, 2004). Esta sobreposição de vias de reparação foi evidenciada no reparo de danos oxidativos endógenos e exógenos (Gellon *et al.*, 2001; Letavayová *et al.*, 2006).

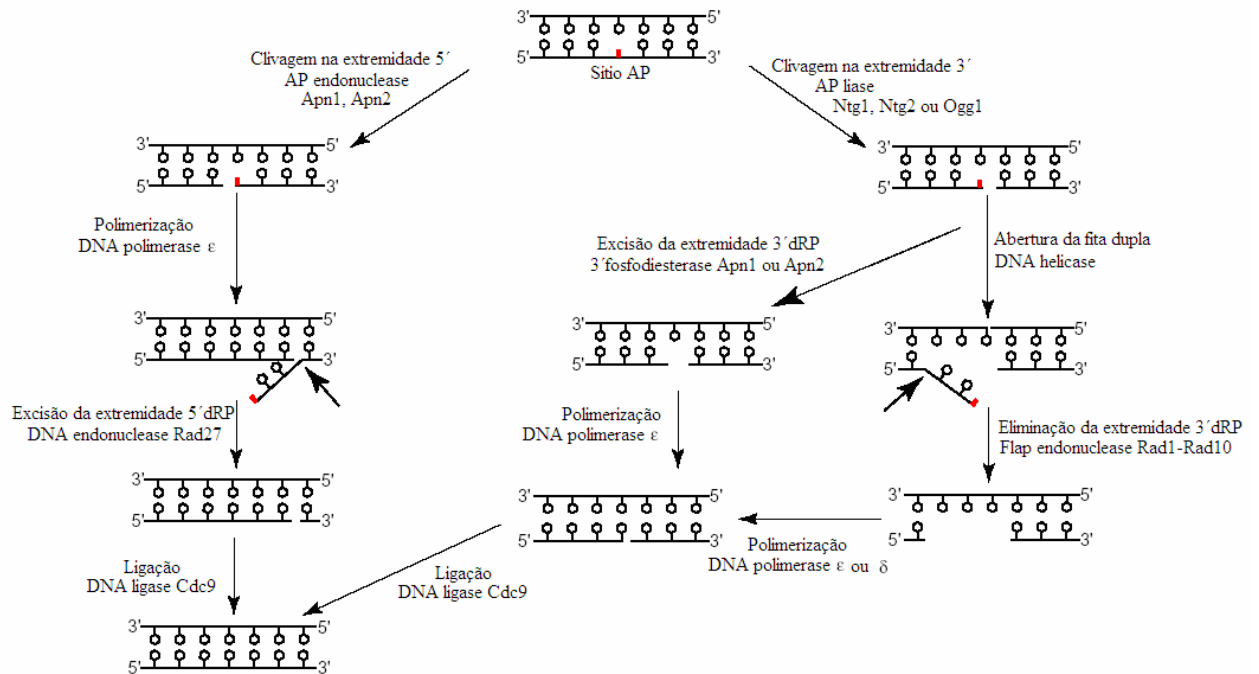


Figura 3: Diagrama da reparação por excisão de bases em *Saccharomyces cerevisiae*. Em linhagens selvagens, a reparação por BER ocorre preferencialmente via AP endonuclease (Apn1), DNA polimerase (Pol ϵ), 5'-flap endonuclease (Rad27) e uma DNA ligase (Cdc9) (Parte esquerda). Uma fração menor de sítios AP é clivada por AP liases (Ntg1, Ntg2 ou Ogg1), seguida pela Apn1 ou Apn2. Uma forma alternativa é a clivagem por Rad1-Rad10 endonuclease (Parte Direita). Adaptado de Boiteux e Guillet, (2004).

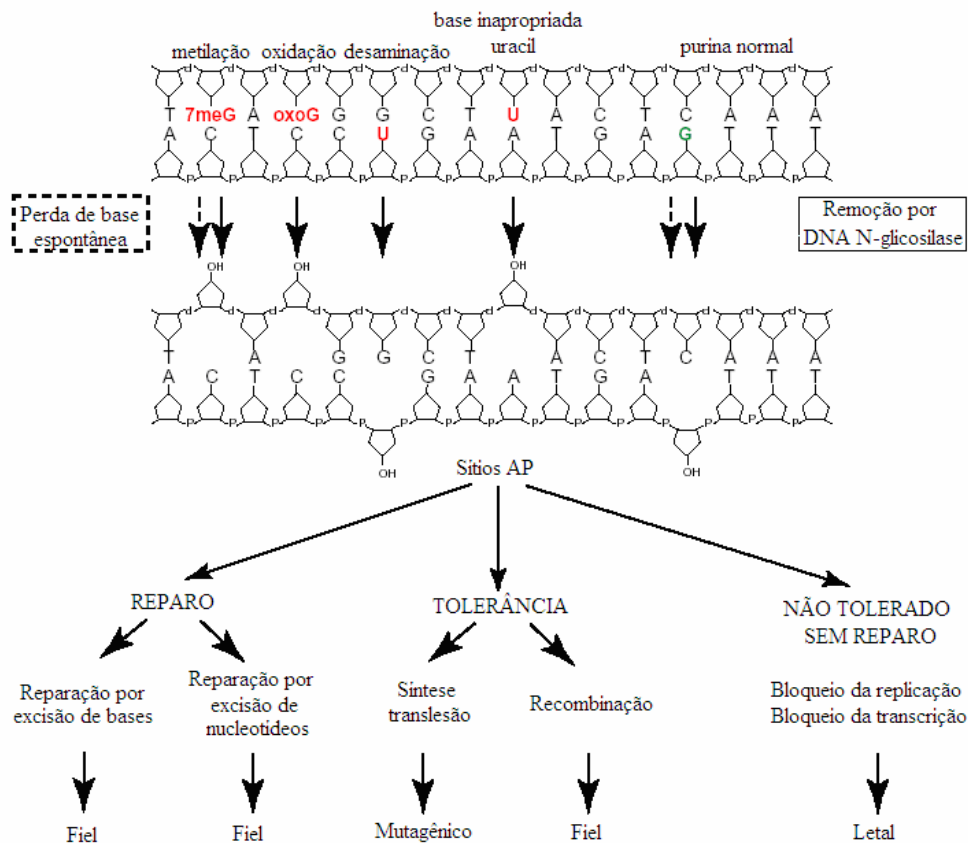


Figura 4: Origem, reparo e conseqüências biológicas de sítios AP no DNA. Os sítios AP, intermediários no BER, podem ser formados pela hidrólise espontânea, excisão de bases normais, inapropriadas ou contendo lesões, pelas DNA glicosilases. Estes sítios podem ser reparados por vias livres de erro, como a reparação por excisão de bases, excisão de nucleotídeos e HR; tolerados por uma via mutagênica como a reparação por síntese translesão; ou se não reparados, podem levar à morte celular. Adaptado de Boiteux e Guillet (2004).

1.4.2. Reparação por excisão de nucleotídeos (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é a via de reparação de DNA mais versátil e flexível. O NER pode remover grande quantidade de lesões estruturalmente não relacionadas, como fotoadutos (dímeros de pirimidina ciclobutano - CPD e 6-4- pirimidina pirimidona - 6-4PP), pontes intra- e inter-cadeia, que distorcem a dupla hélice de DNA e interferem no pareamento de bases, bloqueio da replicação e transcrição (Braithwaite *et al.*, 1999; Prakash e Prakash, 2000; De Santis *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003, van Hoffen *et al.*,

2003). O mecanismo básico desta via tem sido altamente conservado durante a evolução (Costa *et al.*, 2003).

A via NER é composta por uma série de reações enzimáticas que envolvem helicases e endonucleases necessárias para abrir a dupla fita de DNA, clivar a fita contendo a lesão e polimerização utilizando a fita intacta como molde. O reconhecimento do dano é seguido pela ligação de diversas proteínas, clivagem de fita simples nas extremidades 3' e 5' ao dano, removendo o fragmento de oligonucleotídeos contendo a lesão, cujo tamanho é geralmente fixo e independente da natureza do dano (Prakash e Prakash, 2000). Por fim, a DNA polimerase preenche a lacuna e a DNA ligase sela as extremidades, restaurando o DNA (Figura 5) (Braithwaite *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003; van Hoffen *et al.*, 2003; Friedberg *et al.*, 2006; Leibelng *et al.*, 2006).

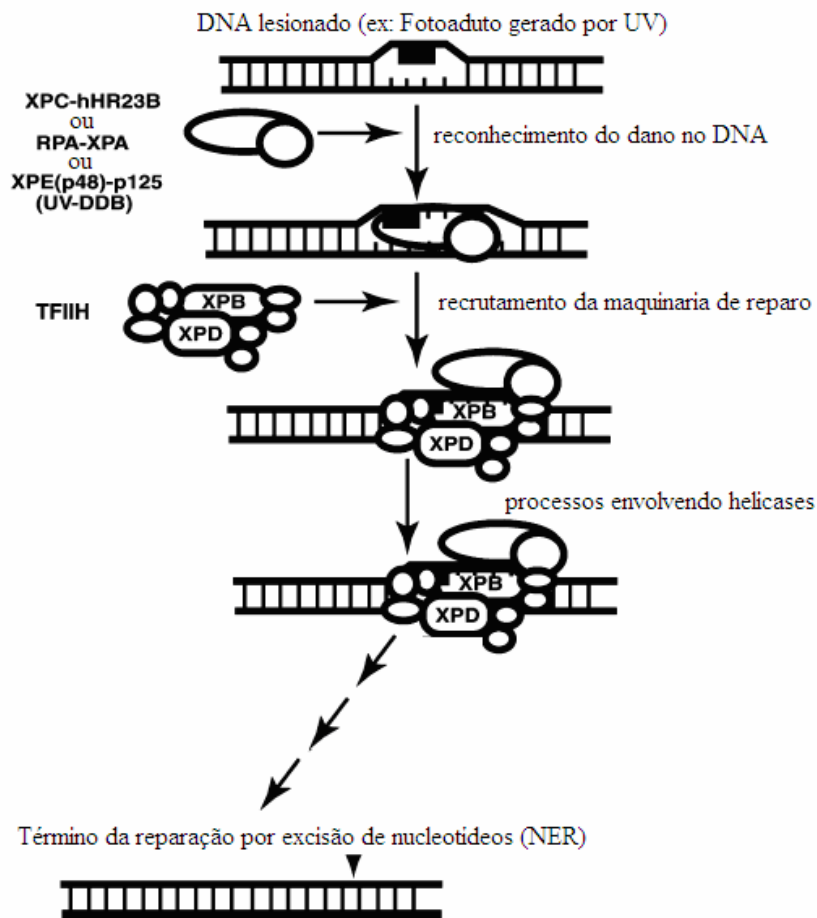


Figura 5: Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos em células de mamíferos. O dano é reconhecido e o complexo de reparação é recrutado. O reparo procede pela da ação de helicases, seguido pela incisão nos dois lados da lesão, e posterior liberação de um fragmento de 24-32 nucleotídeos. O espaço resultante é preenchido pela polimerase, com posterior religação das extremidades. Adaptado de Berstein *et al.* (2002).

Em humanos, foram evidenciados que defeitos em proteínas do NER eram capazes de desencadear doenças genéticas sindrômicas, como o *Xeroderma pigmentosum* (XP), síndrome de Cockayne (CS) e a tricotiodistrofia (TTD). Portadores destas mutações apresentam fotosensibilidade manifestada em diferentes níveis e predisposição ao câncer (Hoeijmakers, 1993, Wood, 1996; Wood, 1997; Prakash e Prakash, 2000; De Santis *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; van Hoffen *et al.*, 2003; Andressoo e Hoeijmakers, 2005;

Andressoo *et al.*, 2006; Gillet e Schärer, 2006; Leibelng *et al.*, 2006; Sarasin e Stary, 2007; Shuck *et al.*, 2008).

O NER está subdividido em duas vias: a reparação acoplada à transcrição (TCR) e a reparação global do genoma (GGR). A TCR é a que repara as lesões presentes em fitas transcritas de genes expressos, enquanto que a GGR atua no resto do genoma (para revisão ver Prakash e Prakash, 2000; De Santis *et al.*, 2002; Plosky *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; van Hoffen *et al.*, 2003; Mellon, 2005; Gillet e Schärer, 2006; Sarasin e Stary, 2007; Shuck *et al.*, 2008). Os mecanismos de reconhecimento do dano por TCR e GGR requerem fatores diferentes. Em GGR, a taxa de reparo depende da distorção acentuada da dupla hélice causada pela lesão e pela estrutura da cromatina, na qual ocorre um desenovelamento no local contendo a lesão, que favorece o acesso das enzimas do NER; este processo envolve XPC-hHR23B, em células de mamíferos. Para que ocorra a TCR, as RNA polimerases I e II são necessárias nas fitas transcritas de genes ativos e as lesões induzidas causam pouca distorção na dupla hélice, porém suficiente para bloquear a transcrição (Figura 6). Além da atividade de reconhecer o dano, acredita-se que a RNA polimerase bloqueada seja capaz de atrair componentes do NER pela interação direta ou pela estrutura da cromatina local que propicia condições ótimas de reparo (van Hoffen *et al.*, 2003).

O processo de remoção de danos por TCR foi descrito primeiramente em células de mamíferos e subseqüentemente em *E. coli* e leveduras (Mellon, 2005). Observou-se que a velocidade de atuação do NER em fitas transcritas de genes ativos é maior que em fitas não transcritas, fato relacionado à reparação preferencial de regiões transcricionalmente ativas de DNA (Friedberg *et al.*, 2006; Sancar, 1996; Costa *et al.*, 2003). A TCR pode ainda contribuir para a remoção de lesões geradas por estresse oxidativo e que normalmente são

reparados por BER (Cline e Hanawalt, 2003; Gallego e Sarasin, 2003; Mellon, 2005) e é importante para a resistência celular após a irradiação com UV em células de mamíferos (De Santis *et al.*, 2002). Além disso, a taxa de GGR também depende do tipo da lesão – fotoprodutos 6-4PP, que geram grande distorção no DNA, são removidos do genoma cinco vezes mais rápido que os CPDs (De Santis *et al.*, 2002; Hanawalt, 2002; Costa *et al.*, 2003; Leibel *et al.*, 2006).

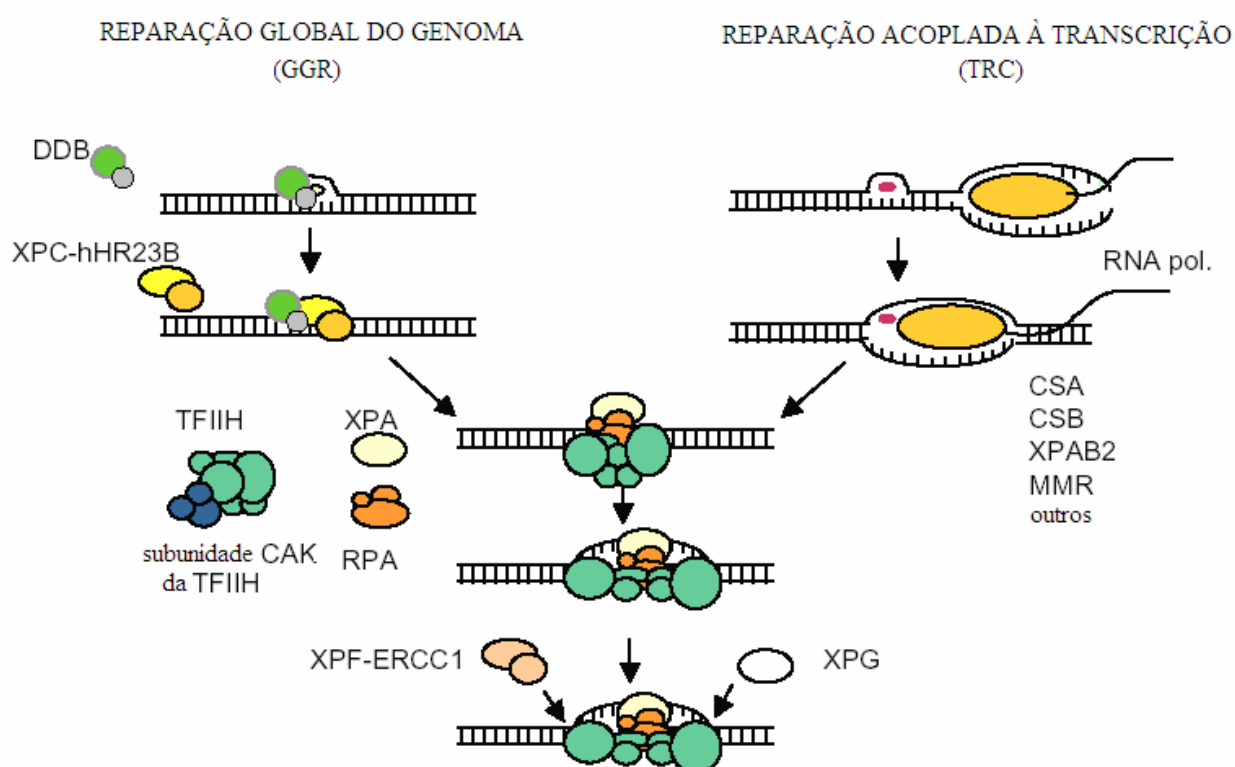


Figura 6: Reparação por excisão de nucleotídeos em células de mamíferos. O reconhecimento do dano é diferente para GGR e TCR, porém, o processamento da lesão requer as mesmas proteínas. Adaptado de van Hoffen *et al.* (2003).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, existem diferentes genes que codificam proteínas essenciais para o reconhecimento da lesão e incisão no DNA, tais como *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10* e *RAD14*. Mutações nestes genes conferem alta sensibilidade à

diversos tipos de mutagênicos, principalmente à radiação UVC (Sweder e Hanawalt, 1992; Friedberg *et al.*, 2006; Prakash e Prakash, 2000).

1.4.3. Reparação pela recombinação homóloga (HR)

As quebras de fita dupla de DNA (DSBs) podem ser induzidas por agentes exógenos, tais como radiação ionizante (Olive, 1998; Wallace, 1998; Jeggo, 1998a), compostos químicos como metilmetanosulfonato e bleomicina (Povirk *et al.*, 1977; Chlebowicz e Jachymczyk, 1979; Povirk, 1996), bem como por agentes endógenos, como radicais livres gerados durante o processo metabólico (Wallace, 1998). No entanto, as DSBs também são formadas durante o reparo de pontes inter-cadeias induzidas no DNA pela fotoadição de psoralenos e pelas mustardas nitrogenadas (Brendel e Henriques, 2001; Brendel *et al.*, 2003), como intermediários durante a recombinação mitótica e meiótica, na replicação de DNA, transposição de elementos móveis, transdução, transformação e conjugação na bactéria, recombinação V(D)J no sistema imunológico de vertebrados, além da ação de enzimas de restrição e topoisomerases (Haber, 1999; Pastink e Lohman, 1999; Flores-Rozas e Kolodner, 2000; Pastink *et al.*, 2001; van der Bosch *et al.*, 2002; Pastwa e Blasiak, 2003; Pitcher *et al.*, 2005; Weterings e Chen, 2007). Este tipo de lesão no DNA é extremamente tóxico à célula, uma vez que pode levar à perda de cromossomos, rearranjos cromossômicos e até o câncer em organismos multicelulares (Jeggo, 1998b; Kanaar *et al.*, 1998; Haber, 1999). Logo, este tipo de dano pode ser reparado por duas vias: a recombinação homóloga (HR) e a não-homóloga (NHEJ) (Pastwa e Blasiak, 2003; Dudasová *et al.*, 2004; Pitcher *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 2007; Weterings e Chen, 2007; Li e Heyer, 2008).

O reparo por HR necessita que a fita homóloga (cromátide-irmã ou cromossomo homólogo) não esteja danificada, uma vez que esta será utilizada como molde no reparo da lesão. Desta forma, esta via de reparo é livre de erros (Saffi e Henriques, 2003; Dudás e Chovanec, 2004; Shuman e Glickman, 2007). Uma vez que HR utiliza uma seqüência de DNA homóloga como molde para o reparo, a HR é ativa durante as fases S e G2 do ciclo celular (Weterings e Chen, 2007).

A reparação por HR é iniciada pela remoção de extremidades 5' nas DSBs pelas nucleases, formando caudas de DNA de fita simples (ssDNA) com extremidade 3'. Em seguida, uma fita ssDNA de extremidade 3' invade o duplex e gera uma estrutura *D-loop*. As duas extremidades 3' servem então de primer para nova síntese de DNA usando o duplex intacto como molde. Este processo, seguido pela ligação, leva à formação de duas junções de *Holliday*, que podem se mover ao longo do DNA e que são clivadas por uma resolvase, gerando produtos com ou sem *crossing-over* (Figura 6) (Pastwa e Blasiak, 2003; Saffi e Henriques, 2003; Dudás e Chovanec, 2004; Shuman e Glickman, 2007; Li e Heyer, 2008).

Esta via de reparação de DNA envolve um grande número de proteínas, como a Rad51, os parálogos de Rad51 (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C e Rad51D), Rad52, Rad54, complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) e proteínas Brca (Thompson e Schild, 2001; Pastwa e Blasiak, 2003; Saffi e Henriques, 2003; Dudás e Chovanec, 2004; Brugmans *et al.*, 2007; Li e Heyer, 2008).

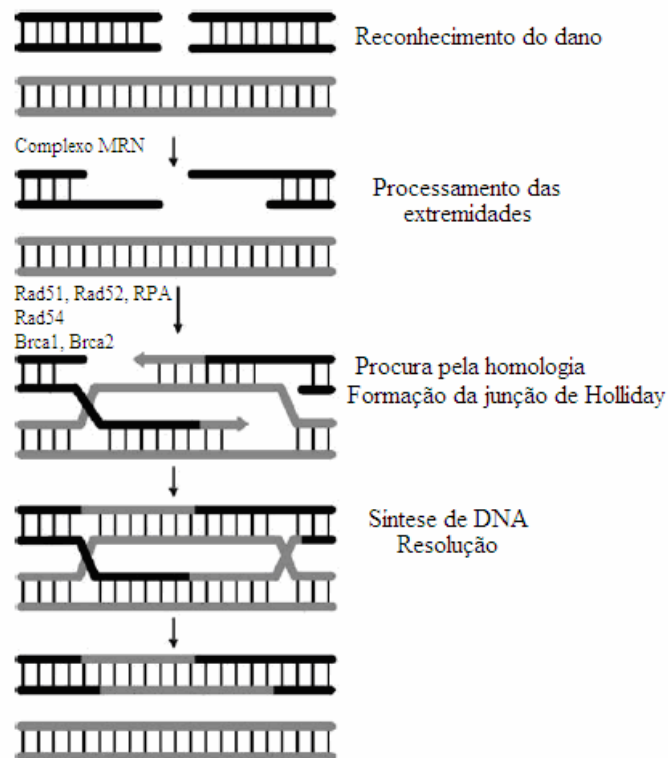


Figura 7: Diagrama do reparo pela recombinação homóloga. As extremidades livres de DNA que são formadas próximas a DSB são reconhecidas e processadas. O filamento de DNA danificado pareia-se com a fita homóloga, a qual serve de molde para síntese de DNA. Adaptado de Brugmans *et al.* (2007).

1.4.4. Reparação por recombinação não-homóloga (NHEJ) ou ilegítima

A reparação por recombinação não-homóloga NHEJ foi inicialmente descrita em células de mamíferos e pode reparar quebras duplas, via ligação direta das extremidades do DNA, sem necessidade de homologia de seqüência. Como consequência, esta via é altamente mutagênica (Pastwa e Blasiak, 2003; Saffi e Henriques, 2003; Dudás e Chovanec, 2004; Dudasová *et al.*, 2004; Pitcher *et al.*, 2005; Shuman e Glickman, 2007).

Na presença de DSBs, o heterodímero Ku (Ku70 e Ku80) se liga às extremidades do DNA, recrutando a subunidade catalítica de proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs) ao sítio da lesão e desencadeando mudanças na estrutura da cromatina, semelhante a

uma heterocromatina condensada em volta da lesão. O processo de ligação das extremidades envolve a DNA ligase IV e XRCC4 (Pastwa e Blasiak, 2003; Brugmans *et al.*, 2007). Após a junção das duas extremidades, DNA-PKcs é fosforilada e altera a estrutura do complexo (Kanaar *et al.*, 1998; Pitcher *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 2007; Weterings e Chen, 2007).

Em células de mamíferos, NHEJ parece ser o principal mecanismo de reparação de quebras duplas (Pastwa e Blasiak, 2003). No entanto, em *Saccharomyces cerevisiae*, NHEJ possui papel secundário no reparo de DSBs, com intensa dominância da HR (Pastwa e Blasiak, 2003). O processo de reparação por NHEJ em *S. cerevisiae* haplóide parece ocorrer na fase G1 do ciclo celular, quando não há cromossomos que propiciem a recombinação homóloga e em fase pós-diáuxica/estacionária; no entanto, em células diplóides de *S. cerevisiae*, NHEJ é suprimida por um fator Nej1 (Non-homologous end joining regulator 1) de repressão (Dudasová *et al.*, 2004; Shuman e Glickman, 2007). Além disso, NHEJ e HR parecem possuir papéis que se sobrepõem durante o reparo de quebras duplas na fase S do ciclo celular (Pastwa e Blasiak, 2003).

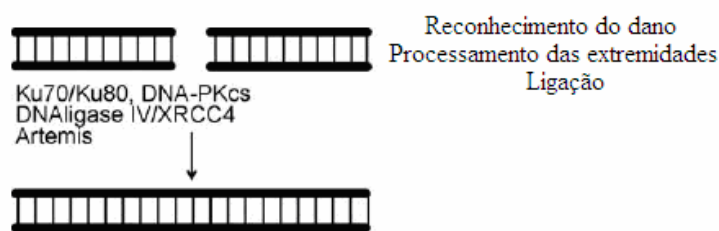


Figura 8: Reparação pela recombinação não-homóloga. A DSB é reconhecida, as extremidades de DNA são processadas e posteriormente religadas. Adaptado de Brugmans *et al.*, 2007.

1.4.5. Reparação por síntese translesão (TLS)

As lesões no DNA que bloqueiam a replicação, consideradas letais, normalmente são reparadas por BER ou NER. No entanto, caso estas vias estejam saturadas ou sejam incapazes de reparar tais lesões devido ao dano ser muito extenso para ser removido eficientemente, pode resultar em morte celular. Para prevenir a morte celular nestes casos, todas as células contêm vias de reparo de DNA de tolerância, que atuam reiniciando a replicação na presença do dano, sem remover a lesão (Walker, 1995; Broomfield *et al.*, 2001; Lawrence e Maher, 2001; Zhu e Zhang, 2003; Friedberg *et al.*, 2006; Lehmann, 2005; Acharya *et al.*, 2006; Gan *et al.*, 2008).

A síntese translesão (TLS) é uma via de reparação de tolerância, pós-replicativa e mutagênica. O DNA lesionado, cuja maquinaria de replicação encontra-se bloqueada, pode ter a fita com lesões replicada pela TLS, na qual uma DNA polimerase mais tolerante às alterações da estrutura molde que as normais, insere um nucleotídeo no lado oposto à base lesada e prolonga a cadeia. Porém, este nucleotídeo que é adicionado, pode ser correspondente ao original ou não e, desta forma, introduzir mutações como substituição de bases, inserção ou deleção no DNA que está sendo reparado (Figura 9) (Prakash e Prakash, 2000; Lawrence *et al.*, 2000; Lawrence e Maher, 2001a; Gan *et al.*, 2008). Conseqüentemente, as células que empregam TLS são capazes de continuar o ciclo celular, porém, com aumento na taxa de mutação (Swanson *et al.*, 1999; Lawrence e Maher, 2001a; Lawrence e Maher, 2001b).

A DNA polimerase responsável pela reparação via TLS não é essencial e em leveduras e possui atividade análoga ao sistema SOS mutagênico de *E. coli* (Broomfield *et al.*, 2001; Goodman, 2002). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a TLS depende do produto dos genes do grupo epistático de Rad6: Rev1, Rev3, Rev7 e Rad30. Rev3 compreende a

subunidade catalítica da DNA polimerase zeta (ζ), e Rev7 outra subunidade desta enzima, capazes de ultrapassar vários tipos de lesões, incluindo dímeros de pirimidina e sítios AP (Swanson *et al.*, 1999; Rajpal *et al.*, 2000; Lawrence e Maher, 2001a; Goodman, 2002; Gan *et al.*, 2008). A polimerase zeta é responsável pela produção de > 98% de substituições de pares de base e > 90% de mutações por deslocamento do quadro de leitura induzido por luz UV. *REV1*, que codifica uma proteína que possui atividade de deoxicitidil transferase capaz de ultrapassar sítios abásicos introduzindo dCMP no lado oposto ao sítio AP, é também responsável por > 95% de substituições de bases causadas por UV e está pouco relacionado com mutações do tipo “frameshift” (Lawrence e Maher, 2001a; Lawrence e Maher, 2001b; Zhu e Zhang, 2003; Lehmann, 2006). *RAD30* codifica a DNA polimerase eta (η), que é capaz de reparar danos gerados por UV via TLS livre de erros, além da alta fidelidade na reparação de lesões como pontes intra-cadeia G-G causadas por cisplatina, danos gerados por acetilaminofluoreno, 8-deoxiguanosina e dímeros de timina. No entanto, a pol η é passível de erro quando repara O⁶-metilguanossina por TLS (Goodman, 2002).

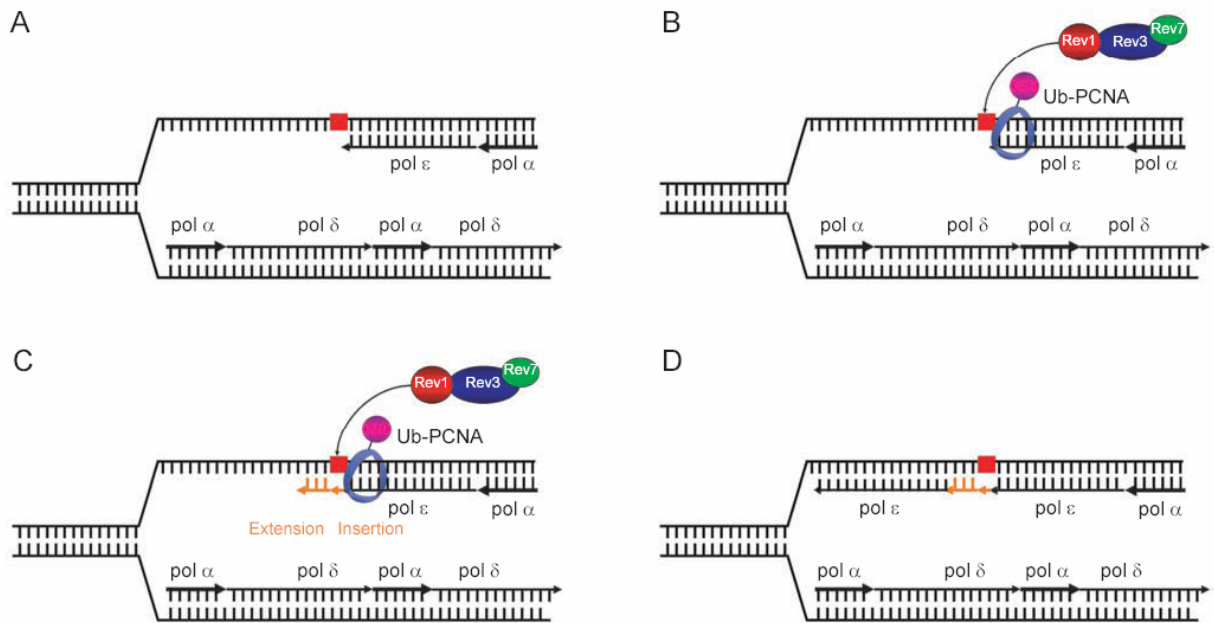


Figura 9: Reparação por síntese translesão em leveduras. O quadrado vermelho representa uma lesão de DNA não codificante. (A) As polimerases replicativas, pol δ e pol ϵ , são responsáveis pela replicação do DNA genômico, porém não são capazes de ultrapassar lesões e param a replicação. (B) Perante a parada da forquilha de replicação, o complexo ubiquitina – PCNA dissocia as polimerases de replicação e recruta polimerases que são capazes de ultrapassar lesões: pol zeta (Rev3-Rev7) associadas a Rev1. (C) Rev3-Rev7 ou possivelmente Rev1, insere um nucleotídeo no filamento oposto ao que contém a lesão, e pol zeta realiza a extensão. (D) Após ultrapassar a lesão, o complexo envolvendo Rev3-Rev7 e Rev1 é dissociado e as polimerases de replicação são re-associadas, dando continuidade à síntese de DNA. Adaptado de Gan *et al.* (2008).

1.4.6. Reparação de bases mal-emparelhadas (MMR)

A reparação de bases mal-emparelhadas no DNA (MMR) é uma via de reparo pós-replicativa que remove bases incorporadas erroneamente e é altamente conservada durante a evolução. O MMR está relacionado à correção de erros na biossíntese de DNA, fidelidade na recombinação gênica e participação nos passos iniciais de paradas de ciclo celular e apoptose em resposta a agentes que causam danos no DNA (Modrich, 2006). Como consequência, a inativação do MMR é associada com o aumento significativo na taxa de mutação espontânea devido aos erros não reparados e alta predisposição ao

desenvolvimento tumoral (Massey *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2006; Modrich, 2006; O'Brien e Brown, 2006).

As células que contêm deficiência em genes de MMR apresentam frequentemente instabilidade genômica, manifestada na forma de repetições de microsátélites e aumento na predisposição de diferentes cânceres (Umar e Kunkel, 1996; Jiricny, 1998a, Aquilina e Bignami, 2001; Massey *et al.*, 2003; Modrich, 2006; Plotz *et al.*, 2006; Imai e Yamamoto, 2007). Em humanos, o câncer colorctal não-poliposo hereditário, endometrial e alguns cânceres esporádicos têm sido atribuídos a mutações em genes do MMR, tais como *hMLH1* e *hMSH2* (Buermeyer *et al.*, 1999; Kolodner e Marsischky, 1999; Harfe e Jinks-Robertson, 2000; Aquilina e Bignami, 2001; Hsieh, 2001; Massey *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2006; Modrich, 2006; O'Brien e Brown, 2006; Plotz *et al.*, 2006).

Além disso, as células deficientes em MMR são altamente resistentes a agentes que causam dano no DNA, como agentes metilantes (a dacarbazine e temozolomide), cisplatina e radiação UV (Aquilina e Bignami, 2001; Massey *et al.*, 2003; Schofield e Hsieh; 2003; Jun *et al.*, 2006; Modrich, 2006) e exibem defeitos em paradas de ciclo celular G2/M perante tratamento com antineoplásicos (O'Brien e Brown, 2006). Como consequência, as lesões que deveriam ser reparadas por MMR são canalizadas para outras vias de reparação, como a HR and TLS e ocorrem falhas na indução de apoptose, que contribuem para aquisição de resistência aos quimioterápicos (Aquilina e Bignami, 2001; O'Brien e Brown, 2006).

O reconhecimento das bases mal-emparelhadas é detectado pela alteração da estrutura resultante do mal-emparelhamento, da deleção ou inserção em uma das fitas do DNA (Yang, 2000; Aquilina e Bignami, 2001). No reparo por MMR em bactérias, a fita molde que contém a seqüência correta é diferenciada da fita filha pelo padrão de metilação:

a fita molde tem suas adeninas nas seqüências d(GATC) metiladas, enquanto que as filhas não apresentam este padrão logo após a replicação (Yang, 2000; Iyer *et al.*, 2006; Jiricny, 2006). A reparação por MMR consiste no reconhecimento da base mal-pareada, selecionar a fita que será reparada, clivagem da fita filha, polimerização e ligação das fitas de DNA (Lahue *et al.*, 1989; Aquilina e Bignami, 2001; Jun *et al.*, 2006; Iyer *et al.*, 2006; Jiricny, 2006).

As proteínas do MMR foram identificadas pela primeira vez em *Streptococcus pneumoniae* (Claverys e Lacks, 1986), porém este sistema foi melhor caracterizado em *E. coli* (Modrich, 1991; Modrich e Lahue, 1996; Aquilina e Bignami, 2001). Neste sistema, as principais proteínas são MutS, MutL e MutH. A MutS tem como função reconhecer o par de base mal-pareado, inserções ou deleções em uma fita e sinalizar outras proteínas para formação do complexo de reparo (Su *et al.*, 1986; Parker e Marinus, 1992; Modrich e Lahue, 1996; Fishel, 1998; Schofield e Hsieh, 2003; Kunkel e Erie, 2005; Jiricny, 2006; Jun *et al.*, 2006; O'Brien e Brown, 2006). A MutH cliva a seqüência d(GATC) não metilada da fita filha e marca o local onde acontecerá o reparo (Welsh *et al.*, 1987). E a MutL é necessária para a interação entre MutS e MutH (Figura 10) (Lu *et al.*, 1984; Kunkel e Erie, 2005; Jiricny, 2006; Jun *et al.*, 2006).

Enquanto que as proteínas MutS e MutL de procariotos funcionam como homooligômeros, as proteínas de eucariotos são heterodiméricas (Jiricny, 1998b; Kolodner e Marsischky, 1999; Harfe e Jinks-Robertson, 2000). Em leveduras existem 6 homólogos para MutS, que são: *MSH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5* e *MSH6*; enquanto que para mamíferos, foram identificados homólogos *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5* e *MSH6* (Hsieh, 2001; Kunkel e Erie, 2005; Iyer *et al.*, 2006). A proteína PMS1, responsável pelo controle de segregação pós-meiótica (Williamson *et al.*, 1985), foi identificada como homóloga ao

MutL (Kramer *et al.*, 1989), bem como MLH1, MLH2 e ML3 (Hsieh, 2001; Kunkel e Erie, 2005; Jun *et al.*, 2006).

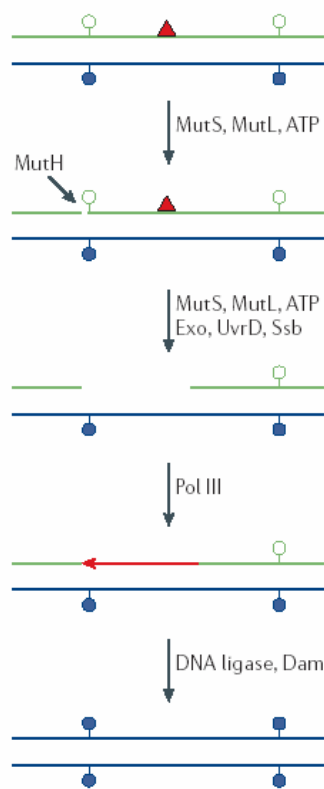


Figura 10: Reparação por MMR em *E. coli*. A fita de DNA recém sintetizada (verde) não apresenta padrão de metilação nos sítios GATC. A base mal-emparelhada (triângulo vermelho) ativa o complexo MutS-MutL-ATP. A MutH endonuclease cliva a fita próximo à seqüência GATC não metilada. A UvrD helicase, junto com outras exonucleases, geram um fragmento de aproximadamente 100 nucleotídeos, o qual é posteriormente preenchido pela pol III e selado pela DNA ligase. Adaptado de Jiricny (2006).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

- Investigar as atividades mutagênicas do antineoplásico 5-FU e seu metabólito ativo FdUMP e as vias de reparação de DNA envolvidas nas lesões geradas por estes quimioterápicos.

2. Objetivos específicos

- Avaliar as atividades citotóxica, genotóxica, clastogênica de 5-FU e FdUMP em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620 (p53-, MMR+), empregando ensaios SRB, cometa e micronúcleos, respectivamente;

- Analisar o ciclo celular e indução de apoptose após tratamento com 5-FU e FdUMP em células tumorais humanas SW620, empregando citometria de fluxo e ensaio de caspase 3/7;

- Investigar as vias de reparação de DNA envolvidas nas lesões geradas por 5-FU e FdUMP em *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO I

**“5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in
human SW620 colon adenocarcinoma cell line”**

**5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in
human SW620 colon adenocarcinoma cell line**

**Matuo R¹; Sousa FG¹; Escargueil AE^{2,3,4,5}, Grivicich I⁶; Santos DG⁷; Chies JAB⁷;
Saffi J^{1,8}; Henriques JAP^{1,5,8*}**

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS Porto Alegre – RS. Brazil.

2. Group of Molecular and Clinical Cancer Therapeutics
Centre de Recherche Saint-Antoine, France

3. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U893, –France

4. Université Pierre et Marie Curie, UMPC06, France

5. Instituto de Biotecnologia /Departamento de Ciências Biomédicas
Universidade de Caxias do Sul – UCS Caxias do Sul – RS. Brazil

6. Laboratório de Marcadores de Estresse Celular/ Centro Pesquisas em Ciências Médicas
Universidade Luterana do Brasil – Ulbra Canoas – RS. Brazil.

7. Laboratório de Imunogenética/Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS Porto Alegre – RS. Brazil.

8. Laboratório de Genética Toxicológica
Universidade Luterana Brasileira – Ulbra Canoas – RS. Brazil.

* to whom correspondence should be addressed

Abstract

5-fluorouracil (5-FU) is an antineoplastic drug widely used to treat cancer. Its cytotoxic effect has been principally ascribed to the misincorporation of fluoronucleotides into DNA and RNA during their synthesis, and the inhibition of thymidylate synthase by FdUMP (one of the 5-FU active metabolites), which leads to nucleotide pool imbalance. In the present study, we compared the mechanisms of action of both 5-FU and FdUMP in human colon SW620 adenocarcinoma cell line. In both cases, we measured the drugs ability to induce apoptosis, and determine their influence on the cell cycle progression in regards to their genotoxic and clastogenic activities. Our results demonstrate that FdUMP is cytotoxic at lower concentration than the 5-FU. Interestingly, while both drugs are able to induce apoptosis, their effect on the cell cycle progression differed. Indeed, 5-FU induces an arrest in G1 while FdUMP causes an arrest in G2. This differential effect on the cell cycle progression is not dependent on the ability of 5-FU or FdUMP to induce global DNA breakages, since, in both cases, we observed the induction of single DNA strand breaks and formation of micronucleus. Thus, we propose that the differential effect of 5-FU and FdUMP on the cell cycle progression depends on the original lesion that is generated by 5-FU or FdUMP and the DNA repair pathway that is in charge to recognized them

Key words: 5-fluorouracil, FdUMP, cytotoxicity, cell cycle arrest, comet assay, apoptosis, micronucleus assay.

1. Introduction

5-fluorouracil (5-FU) is a prodrug used to treat several malignancies, including colorectal, ovary, breast, head and neck cancers (Rahman *et al.*, 2006; Seiple *et al.*, 2006). 5-FU differs from uracil by virtue of a fluorine atom in place of hydrogen at the carbon-5 position of the pyrimidine ring. 5-FU enters cells by nonfacilitated diffusion and facilitated nucleobase transport system; meanwhile fluoronucleosides (FdUrd) enter by a facilitated membrane transport mechanism used by purine and pyrimidine nucleosides (Grem, 1997; Meyers *et al.*, 2003).

5-FU requires uptake and conversion to their active forms before exerting its cytotoxic effects. This effect has been principally ascribed to misincorporation of fluoronucleotides into DNA and RNA, and inhibition of thymidylate synthase (TS) by fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP). When 5-FU is converted to 5-fluorouridine-5'-triphosphate (FUTP) and 5'-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-trifosfato (FdUTP), they can be incorporated into RNA and DNA respectively, and several altered phenomena could be observed in synthesis and stability of these molecules (for review, see Meyers *et al.*, 2003). 5-FU can also be metabolized to FdUMP, which forms a stable complex with TS that catalyzes the conversion of dUMP to dTMP, leading to enzyme inhibition, which results in nucleotide pool imbalances (Meyers *et al.*, 2003; Longley *et al.*, 2004; Fisher *et al.*, 2007).

Two of the three mechanisms involved in 5-FU cytotoxicity act at the level of the DNA. 5-FU directly interferes with DNA through: (i) direct incorporation of deoxyribonucleotide analogue FdUTP into DNA; (ii) incorporation of dUTP into DNA as a consequence of TS inhibition; (iii) enhanced misincorporation of deoxyribonucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) due to decreased fidelity of DNA polymerase in response to dNTP pool imbalances; (iv) inhibition of DNA synthesis as consequence of DNA

polymerase stalling; (v) interference with DNA repair enzymes. Important consequences of such events are the potential mutagenic effects of deoxyribonucleotides misincorporation and the appearance of DNA breaks in the cell's attempts to repair these lesions (Meyers *et al.*, 2003). However, since both the disruption of dNTP pools, as a consequence of TS inhibition, and the direct incorporation of fluoropyrimidine into DNA occur concomitantly, it is difficult to distinguish the relative contribution of both mechanisms in the cytotoxic activity of 5-FU.

FdUMP is believed to be the active metabolite of 5-FU responsible for specifically inhibiting TS. This inhibition results in nucleotide pool imbalance, that increases the concentration of dUTP and consequently induces uracil incorporation into DNA (Welsh *et al.*, 2003). Besides, DNA replication can also be inhibited in response to the dNTP imbalance what could result in cell death by apoptosis (Meyers *et al.*, 2003; Noordhuis *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

The aim of our work is to better understand the specific contribution of FdUMP into the 5-FU cytotoxicity, by comparing the cytotoxic and clastogenic activities of both drugs, in regards to their effects on the induction of apoptosis, the cell cycle progression, and the induction of DNA strand breaks.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

5-Fluorouracil (5-FU) was purchased from ICN Pharmaceuticals. 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP), methyl methane sulfonate (MMS), trichloroacetic acid (TCA), trizma base and sulforhodamine B (SRB) were bought from

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RPMI 1640 culture medium, fetal calf serum, trypsin-EDTA, antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Agarose and low-melting point agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Giemsa stain was bought from Merck (Darmstadt, Germany). BCA protein assay reagent (Pierce) and caspase 3/7 substrate (Peptide Institute) was kindly provided by Dra. Fabiana Horn from Biophysics Department, Federal University of Rio Grande do Sul State. Primary and secondary antibodies for γ H2AX (Upstate Biotechnology and Jackson Immuno Research) was supplied from Group of Molecular and Clinical Cancer Therapeutics, Hôpital Saint-Antoine, Paris.

2.2. Cell line and culture

SW620 human colon cancer cell line was acquired from American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. Cells were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 containing 10% (v/v) fetal calf serum, 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

2.3. Cell viability Assay

For the cell viability assay, 2.5 x 10⁴ cells/well were seeded onto 96 well plates 24h before drug treatment. After, the cells were treated with various concentrations of 5-FU and FdUMP for 24h. Cytotoxicity was assessed by means of the sulforhodamine B (SRB) assay described previous by Li *et al.* (2004), involving *in situ* fixation with TCA, staining with SRB, and solubilization of cell-bound SRB with Trizma base. The latter was colorimetrically assessed with microplate reader at a wavelength of 540nm. The 5-FU and

FdUMP concentrations causing a 50% growth inhibition (IC_{50}) compared with the controls were calculated from a semilogarithmic dose-response curve by linear interpolation.

2.4. Apoptosis

Apoptosis was evaluated by caspase 3/7 assay. 5×10^5 cells were treated with $15.4\mu\text{M}$ of 5-FU and $12.3\mu\text{M}$ of FdUMP for 3, 6, 12, 24 and 48 h. After treatments, the culture medium was removed, cells were washed with PBS and lysed with Triton X-100 0.2% in PBS for 10 min on ice. After centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, protein concentration in cell extracts was estimated using BCA Protein Assay Reagent. $40\mu\text{g}$ protein were incubated with $20\mu\text{M}$ caspase synthetic substrates in 100mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL BSA and 10mM DDT. The substrate tested was Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA. Substrate hydrolysis was monitored for 1.5h at 370nm excitation / 460nm emission in a microplate fluorescence reader; substrate hydrolysis was quantified by comparison with a standard curve for MCA substrates (Bastiani *et al.*, 2005).

2.5. Cell Cycle Analysis

For cell cycle evaluation, 1×10^6 cells were treated with $15.4\mu\text{M}$ of 5-FU and $12.3\mu\text{M}$ of FdUMP for 3, 6, 12, 24 and 48h. After treatments, cells were harvested and fixed in ethanol 70% overnight. The samples were washed in PBS, resuspended in 0.5mL PBS and incubated with RNase A $100\mu\text{g/mL}$ and propidium iodide $50\mu\text{g/mL}$ for 20 min in dark at room temperature. 15,000 cells were analysed by flow cytometry.

2.6. Comet Assay

For genotoxicity assays, 1.0×10^6 cells were seeded on 6-well plates and incubated for 24h. Treatments were performed with concentrations based on IC_{50} defined by the cell viability assay; MMS 4.0×10^{-5} M was used as positive control. Three different treatment times were employed: 3, 6 and 12h.

Protocols of conducting comet assay were based on Tice *et al.* (2000). Cells were harvested with trypsin, centrifuged at 1000 rpm for 5 min and re-suspended in medium. Slides were prepared with 20 μ L of cellular suspension and 120 μ L of low-melting point agarose at 37°C. Slides were immersed in cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) for 1h. Slides were placed in an electrophoresis chamber with cold alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min to allow DNA to unwind. Electrophoresis was performed at 25V and 300mA for 20 min. Slides were then neutralized with Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 15 min and stored at room temperature.

Slides were stained with silver and analyzed in 400X magnification using an optical microscope. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method, as it is highly correlated with computer-based image analysis (Burlinson *et al.*, 2007). Migration of DNA fragments was determined according to comet class as described by (Collins, 2004): *class 0* – intact nuclei, without tail; *class 1* – nuclei with tail less than the diameter of the nucleus; *class 2* – tail size varying between one and two times the diameter of the nucleus; *class 3* – tail size varying between two and three times the diameter of the nucleus; *class 4* – tail size more than three times the diameter of the nucleus but with the head and tail of the comet still distinguishable.

2.7. γ H2AX evaluation

For the γ H2AX evaluation, 1×10^6 cells were treated with 5-FU and FdUMP for 3, 6 and 12h. MMS was employed as positive control. After treatments, cells were harvested with trypsin and fixed in ethanol 70%. Cells were washed with cold PBS and incubated with primary mouse antibody directed against γ H2AX (1:100 dilution) for 2h. The secondary antibody employed was Cy5-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:100 dilution) for 1h. The fluorescence emitted by Cy5 was measured by flow cytometry.

2.8. Micronucleus Assay

For the clastogenicity assay, 5×10^5 cells were seeded on 6-well plates and incubated for 24h. Treatments were performed for 48h. Procedures of harvesting and fixing cells were based on Oliver *et al.* (2006). Cells were harvested with trypsin, hypotonized with sodium citrate 1% and fixed with methanol acetic acid (3:1) prior to transferring to slides.

For micronucleus counts, cells were Giemsa-stained and analyzed in 1000X magnification using optical microscope. A total of 6000 cells were examined per treatment.

2.9. Statistical Analysis

Dose-response curves from cell viability assay were plotted and IC₅₀ values (50% inhibitory concentration) were estimated by regression analysis. Results of the comet assay and the Micronucleus test were evaluated by statistical tests analysis of variance – one way ANOVA, to compare DNA damage between treatments within groups (3, 6 and 12h). Bonferroni's post-hoc test was used to compare treatment groups.

3. Results

3.1. Cytotoxicity of 5-FU and FdUMP towards human SW620 adenocarcinoma cell line

The cytotoxic activity of both compounds was assessed by the SRB assay. Figure 1 shows that FdUMP was slightly more cytotoxic than 5-FU at low concentrations. However, at higher concentrations (above 25 μ M), both drugs showed a similar pattern of cell growth inhibition.

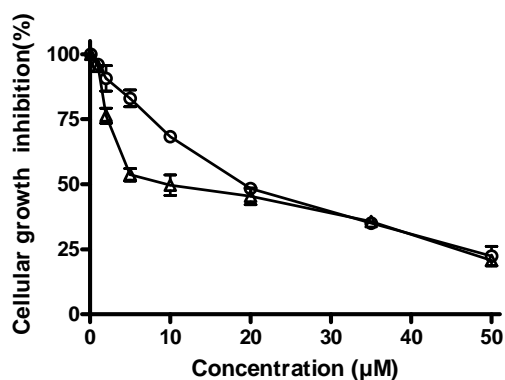


Figure 1: Cytotoxicity of 5-FU and FdUMP in SW620 human colon adenocarcinoma cell line employing the sulforhodamine B assay. The percentage of cellular growth inhibition after treatment with different concentrations of (o) 5-FU and (Δ) FdUMP.

3.2. Apoptosis induction

To determine if the cytotoxic activity of both compounds was correlated with the induction of apoptosis, we measured the caspase 3/7 activation (Wang *et al.*, 2005; Werner and Steinfeldler, 2007) after different times of treatment. Our results show that both drugs induce apoptosis. However, 5-FU acted more quickly than FdUMP. Indeed, apoptosis induction was observed after only 12h of treatment with 5-FU, while FdUMP needed at

least 24h to induce apoptosis at a similar level than 5-FU. However, after 48h of treatment, FdUMP strongly induces apoptosis, significantly more than 5-FU (Figure 2).

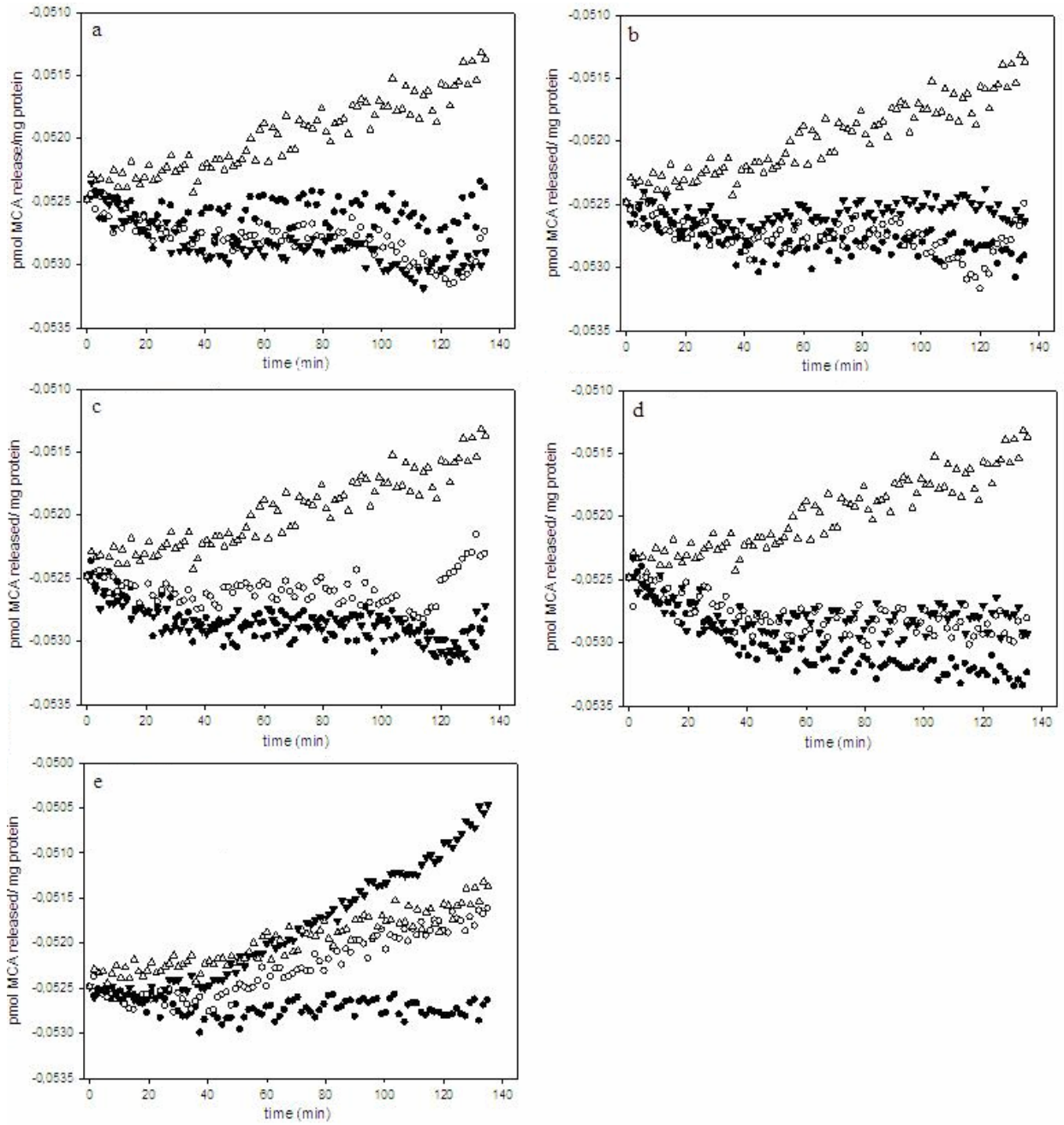


Figure 2: Apoptosis evaluation by caspase 3/7 activation in SW620 treated with 5-FU and FdUMP. The quantity of pMol MCA released per mg of protein after treatment with (●) negative control; (○) 5-FU 15.40 μM; (▼) FdUMP 12.30 μM and (Δ) positive control: culture medium with serum starvation for 72h. Treatments were performed for 3h (a), 6h (b), 12h (c), 24h (d) and 48h (e).

3.3. Cell cycle analysis

To determine if both drugs mediated cell death through an identical process, we determined their effect on the cell cycle progression (figure 3). Surprisingly, our flow cytometry data revealed pronounced differences between cells treated with 5-FU or FdUMP. Indeed, while 5-FU induced a strong G1 cell cycle arrest after 24h of treatment (Fig 3, b lane), FdUMP treatment led to a G2/M arrest suggesting that both drugs induce lesions that affect differentially the cell cycle checkpoints (Fig 3, c lane).

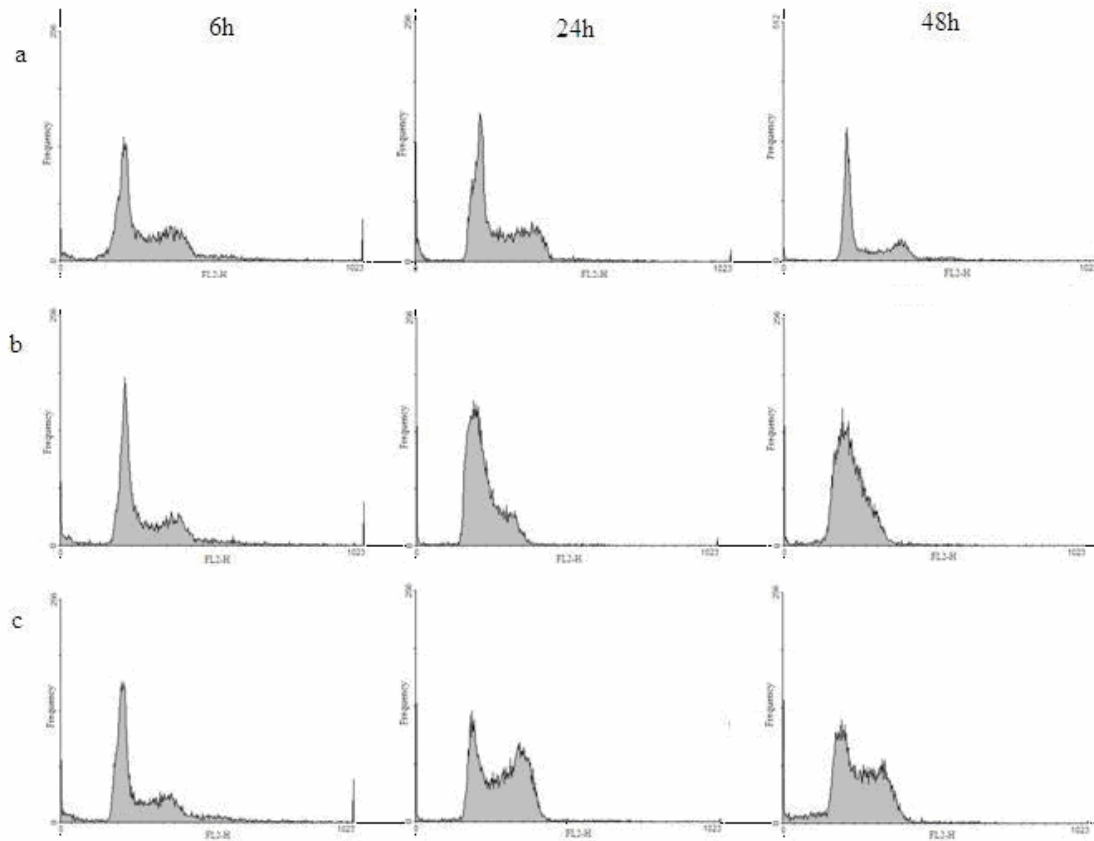


Figure 3: Cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cells evaluated by flow cytometry after treatments with 5-FU and FdUMP. Treatments were performed during 6, 24 and 48h. Lane (a) negative control; lane (b) 5-FU 15.4µM; and lane (c) FdUMP 12.30µM.

3.4. Single cell electrophoresis gel/Comet assay and γ H2AX evaluation

To determine whether the differential effects of both compounds on the cell cycle progression could result from different types of DNA lesions, we used the alkaline version of the comet assay to detect DNA strand breaks, induced by either 5-FU or FdUMP. This assay allows the detection of a broad spectrum of DNA damage including double and single-strand breaks, alkali-labile sites that are expressed as single-strand breaks, DNA-DNA and DNA-protein crosslinking (Burlinson *et al.*, 2007). Table 1 presents the genotoxicity of 5-FU and FdUMP by alkaline comet assay. Cells were scored by visual analysis as described by Collins (2004). Our data showed that both 5-FU and FdUMP induced time-dependent DNA damages. The most significant changes were observed after 6h for 5-FU and 12h for FdUMP.

Table 1: Genotoxicity of 5-FU and FdUMP in SW620 employing alkaline comet assay.

Substances	Dose (μM)	Treatment time and Comet assay parameters		
		3 hours ^a	6 hours	12 hours
Damage Index ^b (DI)				
5-FU	0	5.75 \pm 3.2	5.00 \pm 4.2	5.00 \pm 0.8
	3.85	37.25 \pm 5.6*	49.00 \pm 3.7**	69.75 \pm 14.38***
	7.70	31.00 \pm 8.4	71.25 \pm 9.5***	98.25 \pm 20.5***
	15.40	48.25 \pm 12.6**	79.00 \pm 9.2***	94.00 \pm 13.1***
	30.80	38.00 \pm 14.4*	73.75 \pm 14.3**	81.75 \pm 9.97***
FdUMP	0	7.5 \pm 0.9	8.00 \pm 1.8	7.25 \pm 2.9
	3.07	6.50 \pm 3.7	31.25 \pm 23.2	64.75 \pm 7.8***
	6.15	2.00 \pm 0.8	34.50 \pm 12.6	77.75 \pm 6.7***
	12.30	4.25 \pm 3.7	32.50 \pm 14.8	87.75 \pm 3.8***
	24.60	2.00 \pm 3.36	36.50 \pm 16.5*	93.00 \pm 3.9***
MMS ^c	40	334.75 \pm 42.5***	341.50 \pm 45.1***	386.00 \pm 5.8***

^a SW620 cells were exposure to different times of treatment with 5-FU and FdUMP.

^b Mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experimental – total of three experiments for each substance.

^c MMS was employed as positive control.

*Significance: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 (ANOVA, Bonferroni's post test).

To further characterize the type of damages that were generated by either 5-FU or FdUMP, we measured, by flow cytometry, the appearance of the γ H2AX phosphoepitope. This phosphorylated form of the histone H2AX (γ H2AX) is indeed considered as a specific marker for the detection of DNA double-strand breaks (Soares *et al.*, 2007). Our data clearly show that only the 5-FU was able to induce a strong γ H2AX labeling. However, this phenomenon was only observed after 12h of treatment (Figure 4), time that corresponds to the induction of the apoptosis (figure 2). Interestingly, at the same time point, FdUMP induced a much slighter γ H2AX labeling which is in agreement with a later induction of the apoptosis. At drug concentrations lower than the IC50, no γ H2AX labeling could be detected for both compounds while damages could be observed by alkaline comet assay (data not shown, Table 1). Thus, it is likely that the formation of DNA double strand breaks is not due to a direct effect of either 5-FU or FdUMP, but comes from the induction of the programmed cell death.

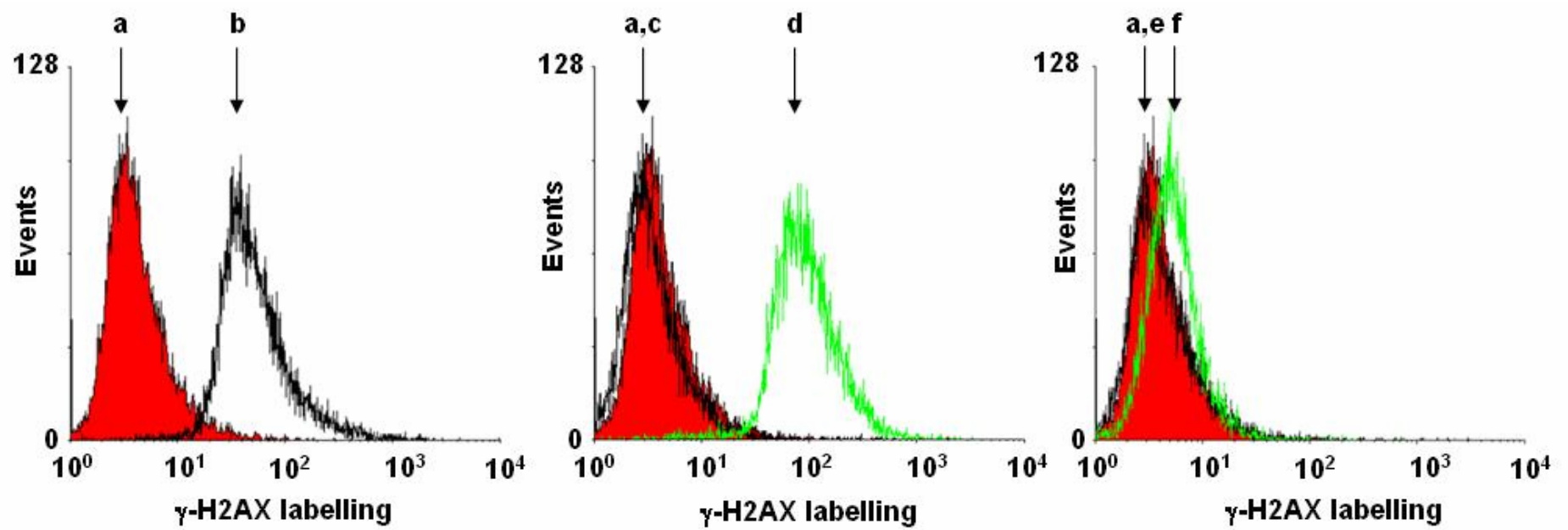


Figure 4: Time course of γ H2AX fluorescence after 5-FU and FdUMP treatment in SW620 cells. Legend for figure: (a) untreated cells; (b) positive control employing MMS (40 μ M); (c) 5-FU 15.40 μ M for 3h; (d) 5-FU 15.40 μ M for 12h; (e) FdUMP 12.30 μ M for 3h; (f) FdUMP 12.30 μ M for 12h.

3.5. Micronucleus Assay

It has been shown that the deoxyribonucleotides misincorporation that can be induced in response to the use of drugs such as 5-FU can have a potent mutagenic activity, if not repaired efficiently (Meyers *et al.*, 2003). Thus, to determine if the DNA lesions induced by either 5-FU or FdUMP are efficiently repaired, we performed in both cases the micronucleus assay. Cells were treated for 48h, to allow them to divide twice during the drug exposure time (Matsushima *et al.*, 1999). The results, showed on Figure 5, revealed a clear dose-dependent clastogenic effect of both 5-FU and FdUMP. Interestingly, while at high drug concentrations, the effects of both compounds appear to be identical, the clastogenic activity of FdUMP seems to be stronger at low drug concentration. Together, these data strongly suggest that both drugs are able to induce DNA lesions that are poorly repaired leading to a higher mutation rate.

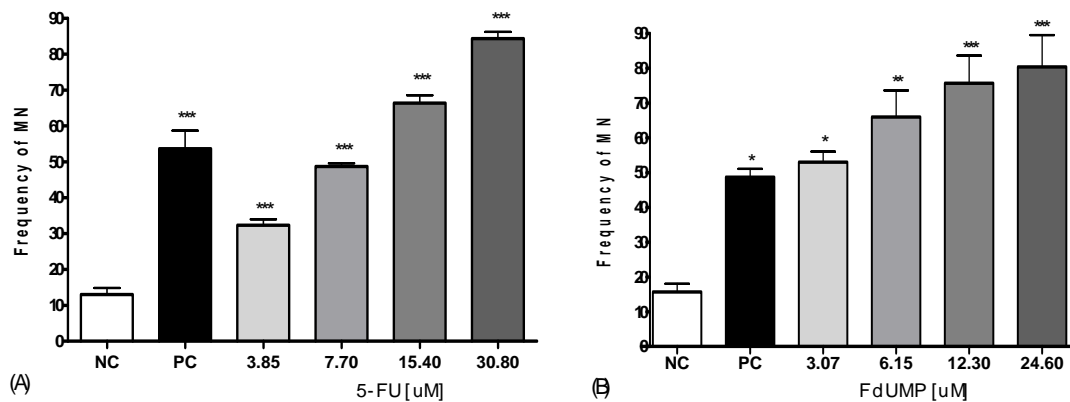


Figure 5: Frequency of micronucleus in treatment with different concentrations of 5-FU (A) and FdUMP (B) in human colon adenocarcinoma cells. NC: negative control (culture medium); PC: positive control employing MMS (4×10^{-5} M). The symbols represent: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Bonferroni's post-hoc test): MMS, 5-FU and FdUMP compared with NC.

4. Discussion

Many studies have been conducted in order to better understand the mechanism of action on the antineoplastic drug 5-FU. However, despite these efforts, the exact contribution of its different active metabolites remains unclear. Thus, to clarify the role of FdUMP in the 5-FU cytotoxic effect, we compared how both compounds were able to affect the biology of the cell.

In this study, we evaluated the cytotoxic, genotoxic and clastogenic activities of both 5-FU and FdUMP in SW620 human carcinoma cell line. Our results show that FdUMP is slightly more cytotoxic than 5-FU at low drug concentrations (Figure 1). Both drugs are inducing apoptosis (figure 2). The induction of the apoptosis seems to be more rapid for 5-FU than for FdUMP. However, after a long exposure time, FdUMP seems to induce apoptosis more strongly than the 5-FU. While the cytotoxic activities of both compounds appeared quite similar, the two drugs influenced differentially the cell cycle progression. Indeed, while 5-FU induced a G1/S arrest (Figure 3b), FdUMP led to a G2/M arrest (Figure 3c) suggesting that both compounds could induce different type of DNA lesions that lead to the activation of different checkpoints. To characterize the type of damages, we thus performed alkaline comet assay and γ H2AX labeling. In both cases, the formation of DNA double strand breaks did not seem to be a direct effect of the drug since, at least in the case of 5-FU, they only appeared concomitantly with the induction of the apoptosis. However, 5-FU as well as FdUMP, induced DNA damages as revealed by alkaline comet assay (Table 1). The fact that these two drugs do not induce directly the phosphorylation of the histone H2AX strongly suggest that they are mainly inducing DNA single strand breaks. To determine if the damages visualized by the comet assay were prone to be repaired, we performed the micronucleus assay. In both cases, the frequency of

miconucleus increased in a dose-response manner suggesting that the induced DNA lesions persisted after replication. Interestingly, in a similar manner to its cytotoxic activity, the clastogenic activity of FdUMP, compare to 5-FU, seems to be higher at low concentration. However, at high concentration, both compounds behaved identically.

Many authors have proposed that 5-FU and FdUMP cause DNA single-strand breaks through different mechanisms: (i) fluoropyrimidines and uracil incorporated into DNA would be recognized by repair machinery and the failure of repair could result in strand breaks (Seiple *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2008); (ii) the enzyme Top1 could be trapped by abasic sites, uracil and fluoropyrimidines misincorporations, and these inhibition would result in DNA strand breaks (for review, see Liao *et al.*, 2005). Other reports have shown that, in agreement with our FdUMP data, the inhibition of TS by CB3717, ZD9331 and raltitrexed causes, DNA single-strand breaks (Curtin *et al.*, 1991; Webley *et al.*, 2000; Webley *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2003).

In the present study, we show that both 5-FU and FdUMP cause DNA damages. However, these lesions induce different patterns of cell cycle arrest suggesting that both drugs induce different type of primary DNA lesions that could lead to the activation of different checkpoints. Mismatched bases incorporated into DNA as fluoropyrimidines and uracil are usually removed by either base excision repair (BER) or mismatch repair (MMR) pathways. BER recognized, through DNA glycosylases, both abnormal and mismatched bases (Boiteux & Guillet, 2004). BER is active throughout the cell cycle while MMR, that is also eliminating incorrect base pairings and insertion/deletion loops, is acting during DNA replication. BER usually recognizes uracil and A:5-FU lesions, while MMR mainly processes G:5-FU lesions (Meyers *et al.*, 2003). However, in the presence of high dUTP ratios, both BER and MMR induce futile cycles of nucleotide incorporations,

excision and repair, that eventually lead to an increased recombination, DNA breaks and apoptosis (Ladner, 2001; Meyers *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2005; Longley *et al.*, 2006). It has recently been proposed that the G2 arrest observed in response to fluoropyrimidines could principally be the result of the activation of the mismatch repair pathway (Meyers *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005), suggesting that the lesions that are induced by FdUMP could be primarily processed by this repair pathway. It has also been reported that the G1 arrest observed after treatment with 5-FU is mainly due to its effect on RNAs (Maybaum *et al.*, 1980; Pizzorno *et al.*, 1995). Indeed, the authors suggest, in these works, that the DNA-directed toxicity of 5-FU causes an immediate growth inhibition and arrest of the cells in S-phase. Only, later on, the RNA-directed toxicity of 5-FU blocks the cells in G1 (Maybaum *et al.*, 1980; Pizzorno *et al.*, 1995).

In the present work, we proposed that 5-FU and FdUMP induce different types of lesion in human colon adenocarcinoma cells SW620 which could result in the activation of different DNA repair pathways. Lesions that are induced by 5-FU can probably be repaired by either BER or MMR. Together, our data demonstrate that the cell cycle arrest in G1, induced by the 5-FU, is not due to the inhibition of the thymidylate synthase but rather to the direct incorporation of fluoropyrimidines into the DNA or RNA. In contrast, the inhibition of the thymidylate synthase is likely to induce an enhanced misincorporation of deoxyribonucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dUTP) during replication leading to the activation of the MMR and thus the arrest in G2, observed after treatment with FdUMP.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Dra. Fabiana Horn (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biofísica) and her assistants for helping us with caspase experiments. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS; Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; GENOTOX-Royal Institute - Biotechnology Center – University of Rio Grande do Sul. Matuo R. held a CNPq fellowship and is a Masters student from UFRGS and Escargueil A.E. held a CAPES fellowship for visiting professorship.

References

- Bastiani M, Vidotto MC and Horn F (2005) An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 253:133-140.
- Boiteux S and Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3:1-12.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M and Hartmann A (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627:31-35.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261.
- Curtin NJ, Harris AL and Aherne GW (1991) Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res* 51:2346:2352.
- Fisher F, Baerenfaller K and Jiricny J (2007) 5-fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterol* 133:1858-1868.
- Grem JL (1997) Mechanisms of action and modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol* 7:249-259.
- Ladner RD (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Peptides Sci* 2:361-370.
- Li L, Berger SH and Wyatt MD (2004) Involvement of base excision repair in response to therapy target at thymidylate synthase. *Mol Cancer Ther* 3:747-753.
- Li L, Connor EE, Berger SH and Wyatt MD (2005) Determination of apoptosis, uracil incorporation, DNA strand breaks, and sister chromatid exchanges under conditions of thymidylate deprivation in a model of BER deficiency. *Biochem Pharmacol* 70:1458-1468.
- Liao ZY, Sordet O, Zhang HL, Kohlhagen G, Antony S, Gmeiner WH and Pommier Y (2005) A novel polypyrimidine antitumor agent FdUMP[10] induces thymidineless death with topoisomerase I – DNA complexes. *Cancer Res* 65:4844-4851.
- Longley DB, Allen WL, McDermott U, Wilson TR, Latif T, Boyer J, Lynch M and Johnston PG (2004) The roles of Thymidylate synthase and p53 in regulation mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin Cancer Res* 10:3562-3571.

- Longley DB, Allen WL and Johnston PG (2006). Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766:184-196.
- Luo Y, Walla M and Wyatt MD (2008) Uracil incorporation into genomic DNA does not predict toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase. *DNA Repair* 7:162-169.
- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate Jr M, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K and Sofuni T (1999) Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14:569-580.
- Maybaum J, Ullman B, Mandel HG, Day JL and Sadee W (1980) Regulation of RNA and DNA direct actions of 5-fluoropyrimidines in mouse T-lymphoma (S49) cells. *Cancer Res* 40:4209-4215.
- Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD and Boothman DA (2003) A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene* 22:7376-7388.
- Meyers M, Wagner MW, Mazurek A, Schmutte C, Fishel R and Boothman (2005) DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem* 280:5516-5526.
- Noordhuis P, Holwerda U, van der Wilt CL, van Groening CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM and Peters GJ (2004) 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals Oncol* 15:1025-1032.
- Oliver J, Meunier JR, Awogi T, Elhajouji A, Ouldeldhkin MC, Bichet N, Thybaud V, Lorenzon G, Marzin D and Lorge E (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test V. Using L5178Y cells. *Mutat Res* 607:125-152.
- Pizzorno G, Sun Z and Handschumacher RE (1995) Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 49:553-557.
- Rahman Z, Kohli K, Khar RK, Ali M, Charoo NA and Shamsher AAA (2006) Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS PharmSciTech* 7.
- Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M and Stivers JT (2006) Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acid Res* 34:140-151.
- Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, Gramont A, Bonatto D, Henriques JAP and Larsen AK (2007) Replication and homologous recombination repair

regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13062-13067.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Wang ZB, Liu YQ and Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Internatl* 29:489-496.

Webley SD, Hardcastle A, Ladner RD, Jackman AL and Aherne GW (2000) Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to the thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331. *Br J Cancer* 83:792-799.

Webley SD, Hardcastle A, Ladner RD, Jackman AL and Aherne GW (2001) The ability to accumulate deoxyuridine triphosphate and cellular response to thymidylate synthase inhibition. *Br J Cancer* 85:446-452.

Welsh SJ, Hobbs S and Aherne GW (2003) Expression of uracil DNA glycosylase (UDG) does not affect cellular sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibition. *Eur J Cancer* 39:378-387.

Werner JM and Steinfeldt HJ (2007) A microscope technique to study kinetics and concentration – response of drug induced caspase 3 activation on a single cell level. *J Pharmacol Toxicol Method* *in press*.

CAPÍTULO II

**“Involvement of Base excision repair pathway in repairing lesions
induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP”**

Involvement of Base excision repair pathway in repairing lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP

Matuo R¹; Sousa FG¹; Escargueil AE^{2,3,4,5}; Grivicich I⁶, Saffi J^{1,7}; Henriques JAP^{1,5,7*}

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS Porto Alegre – RS. Brazil.

2. Group of Molecular and Clinical Cancer Therapeutics
Centre de Recherche Saint-Antoine, France

3. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U893, –France

4. Université Pierre et Marie Curie, UMPC06, France

5. Instituto de Biotecnologia /Departamento de Ciências Biomédicas
Universidade de Caxias do Sul – UCS Caxias do Sul – RS. Brazil

6. Laboratório de Marcadores de Estresse Celular/ Centro Pesquisas em Ciências Médicas
Universidade Luterana do Brasil – Ulbra Canoas – RS. Brazil.

7. Laboratório de Genética Toxicológica
Universidade Luterana Brasileira – Ulbra Canoas – RS. Brazil.

* to whom correspondence should be addressed

Abstract

5-fluorouracil (5-FU) is an antimetabolite antineoplastic drug that can be converted to fluoronucleotides, and then incorporated into DNA and RNA; or another possibility is to be metabolized to FdUMP what leads to nucleotide pool imbalance. This work aimed to examine the sensitivity of DNA repair pathways in lesions generated by 5-FU and FdUMP in *Saccharomyces cerevisiae* strains. We employed strains deficient in base excision repair – BER (*ung1Δ*, *apn1Δ*, *rad27Δ* *ntg1Δ*, *ntg2Δ*, *ntg1Δntg2Δ* double-, *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutant), nucleotide excision repair - NER (*rad1Δ* and *rad10Δ*), translesion synthesis - TLS (*rev1Δ* and *rev3Δ*), homologous recombination – HR (*rad52Δ*) and non-homologous end joining – NHEJ (*rad50Δ*). Results of 5-FU survival assay showed high sensitivity of *apn1Δ*, *ntg2Δ*, *ntg1Δntg2Δ* double and *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutants. However, for treatment with FdUMP it was only observed sensitivity only in *apn1Δ*, *ntg1Δntg2Δ* double and *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutant strains. Deficiencies in these BER genes (*NTG1*, *NTG2* and *APN1*) lead to AP sites accumulation that results in high toxicity. For both drugs, deficiencies in NER, HR, NHEJ and TLS did not present differences in cytotoxicity when compared to WT. By investigating the overlay of DNA pathways, we observed that the mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* was very sensitive to 5-FU. However this same strain was not sensitized by FdUMP. It indicates that BER recognizes fluoronucleotides and generates DNA single and double strand breaks that are intermediate substrates for HR (Type *RAD52*). The quadruple mutants *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* showed a weak sensitivity after treatment with 5-FU. However, for treatment with FdUMP they show the same sensitivity to that observed for its isogenic WT strain. These results suggest that NER and TLS have only a minority role in the repair of 5-FU induced lesions. Damage caused by 5-FU is probably due to

misincorporation of fluoronucleotides into DNA and RNA, while FdUMP leads to the increase of uracil in DNA. These mismatched bases are mainly repaired by BER machinery mainly and could present influence in some in genes and pathways involved in repairing fluoronucleotides and uracil.

Key words: 5-fluorouracil, FdUMP, *Saccharomyces cerevisiae*, DNA repair pathways

1. Introduction

5-fluorouracil (5-FU) is a chemotherapeutic drug pyrimidine analogue employed in the treatment of several cancers, mainly colorectal and it has been largely employed in the clinic for 40 years (Grem, 1997; Rahman *et al.*, 2006).

The mechanisms of 5-FU cytotoxicity involve the conversion to fluoronucleotides or to FdUMP. The fluoronucleotides could be incorporated into DNA and RNA during synthesis (De Angelis, 2006), resulting in mutations and protein miscoding (Rosen *et al.*, 1969) or triggering apoptosis (Morio *et al.*, 2004), besides inhibiting processing of pre-rRNA (Ghoshal and Jacob, 1994), post transcriptional modification of tRNAs (Santi and Hardy, 1987), polyadenylation and splicing of mRNA (Grem, 1997). Meanwhile, FdUMP inhibits the enzyme thymidilate synthase (TS), what leads to nucleotide pool imbalance, decreasing dTMP and increasing dUMP concentrations and consequently, uracil is incorporated into DNA (Grem, 1997; Meyers *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2007).

The presence of 5-FU and high concentrations of uracil inside the cell result in cycles of incorporation of uracil base, excision and repair because of altered nucleotide pools. This mismatched uracil is removed from DNA by uracil glycosylases, the DNA backbone is nicked by an abasic endonuclease, the blocking 5' deoxyribose phosphate is removed by a flap endonuclease and the resulting gap is filled in using another dUMP through the action of a repair DNA polymerase and DNA ligase (Seiple *et al.*, 2006).

Previous studies have demonstrated that excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts (Andersen *et al.*, 2004) and *Saccharomyces cerevisiae*. However, the accumulation of toxic repair intermediates such as abasic sites, single strand breaks, double strand breaks in the DNA, any of which may promote cell death (Tinkelenberg *et al.*, 2002). In according to this, Seiple *et al.*

(2006), employing *S. cerevisiae* strains deficient in repair genes, described that the deletion of *ung1*, uracil DNA glycosylase, has a protective effect against 5-FU, in contrast to deletion of *Apn1*, the major abasic site endonuclease of yeast, that results in a large increase in the potency and efficacy of 5-FU. In this case, the loss of uracil glycosylase activity should decrease DNA breaks arising from attempted repair and thereby decrease the toxicity of thymidine depletion.

This work aimed to investigate how 5-FU and its metabolite FdUMP are repaired by different pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. We performed survival assays to compare the sensitivity among strains deficient in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ) and translesion synthesis (TLS) single, double and triple mutants, and quadruple mutants involving BER and NER, HR or TLS to evaluate the overlay of DNA repair pathways.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

5-Fluorouracil (5-FU) was purchased from ICN Pharmaceuticals. 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP) was bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Culture medium was acquired from Merck.

2.2. Yeast strains and media

The relevant genotypes of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work are given in Table 1. Complete liquid medium (YPD) containing 1% (w/v) yeast extract, 2%

(w/v) bacto-peptone and 2% (w/v) glucose was employed for routine growth. Medium containing 2% (w/v) bacto-agar was used for plates. Minimal medium (MM) contained 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) bacto-agar. Synthetic complete medium was MM supplemented with 2mg adenine, 2mg arginine, 5mg lysine, 1mg histidine, 2mg leucine, 2mg methionine, 2mg uracil, 2mg triptophan and 24mg threonine per 100mL MM.

Table 1: Yeast strains used in this study

Strains	Relevant genotypes	DNA repair pathway affected	Source
BY4742 (WT)	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	-	Euroscarf
<i>ung1Δ</i>	BY4742; with <i>ung1::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
<i>apn1Δ</i>	BY4742; with <i>apn1::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
<i>rad1Δ</i>	BY4742; with <i>rad1::kanMX4</i>	NER	Euroscarf
<i>rad10Δ</i>	BY4742; with <i>rad10::kanMX4</i>	NER	Euroscarf
<i>rad27Δ</i>	BY4742; with <i>rad27::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
<i>rad50Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
<i>rad52Δ</i>	BY4742; with <i>rad52::kanMX4</i>	HR	Euroscarf
<i>rev1Δ</i>	BY4742; with <i>rev1::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
<i>rev3Δ</i>	BY4742; with <i>rev3::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
SJR751 (WT)	<i>MATα</i> ; <i>ade2-101_{oc}</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>ura3ΔNco</i> ; <i>lys2ΔBgl</i> ; <i>leu2-R</i>	-	RL Swanson*
<i>ntg1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg2Δ</i>	SJR751; with <i>ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad1::hisG</i>	BER/NER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rev3Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rev3::kanMX4</i>	BER/TLS	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad52::URA3</i>	BER/HR	RL Swanson*

* Swanson *et al.* (1999)

2.3. Yeast growth conditions

Exponential phase (LOG) cultures were obtained by inoculation of 5×10^5 cells/mL of YPD culture in stationary phase into 5mL of fresh YPD medium. After 14h incubation,

at 30°C with aeration, the cultures contained $(1-2) \times 10^7$ cells/mL with 20-30% budding cells. The number of cells was determined by counting in Neubauer chamber.

2.4. Survival assays

Survival after treatment with 5-FU and FdUMP was measured by preparing cell suspension containing 5×10^6 LOG cells/mL and incubated in culture medium at 30°C for 4h with agitation. After incubation, samples were diluted in saline solution, plated onto YPD agar, and incubated at 30°C for 2-3 days. 5-FU concentrations employed were: 18.75, 37.5, 75 and 150 μ M; and FdUMP: 37.5, 75, 150 and 300 μ M. Assays were performed in triplicate for each dose.

3. Results and Discussion

5-FU has been largely employed in the treatment of malignances and some studies have been conducted to a better comprehension of its mechanisms of action and cytotoxicity (Rosen *et al.*, 1969; Santi and Hardy, 1987; Ghoshal and Jacob, 1994; Grem, 1997; Morio *et al.*, 2004; De Angelis, 2006). Once 5-FU is converted to fluoronucleotides, they could be incorporated to nucleic acids and alter their function and stability; other possibility is the incorporation of uracil in the DNA as consequence of nucleotide pool imbalance by FdUMP that inhibits thymidilate synthase (Grem, 1997; Tokunaga *et al.*, 2000). These mismatched bases are recognized by DNA repair machinery and recruits several enzymes since removing the error base to relegate the strain. However, many intermediates of this process of DNA repair are toxic, mainly AP sites generated by endonucleases (Seiple *et al.*, 2006).

Cytotoxic effects of 5-FU and FdUMP on *Saccharomyces cerevisiae* depend on the growth phase and conditions of treatment. Cells in stationary phase and treated in saline solution did not present significant cytotoxic activity (data not shown). This probably happens once 5-FU and FdUMP cytotoxicity are dependent on misincorporation in nucleic acids during the S-phase of cell cycle (De Angelis, 2006). Therefore, the logarithmic phase is the more appropriate to evaluate these effects.

In the present work, results of survival assays demonstrated that 5-FU leads to a pronounced sensitivity of *apn1Δ*, *ntg2Δ*, *ntg1Δntg2Δ* double-, *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple- and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* quadruple mutants (Fig. 1E and 1F). On the other hand, treatments with FdUMP sensitized only in *apn1Δ*, *ntg1Δntg2Δ* double, *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutants (Fig. 2E). *Apn1*, *Ntg1* and *Ntg2* are important proteins of BER, since *Apn1* is the the major AP endonuclease in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ntg1* and *Ntg2* are DNA glycosilases and AP lyases. In the absence of these proteins, there is an accumulation of AP sites generated after removing the mismatched base, which are extremely toxic to cells, once they could lead to formation of single-strand breaks (Meadows *et al.*, 2003; Seiple *et al.*, 2006). *Ntg1* and *Ntg2* recognize and remove the damaged base, generating AP sites that can be removed by their lyases activity or by one endonuclease *Apn1*. Our results showed that the triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* is very sensitive to 5-FU and FdUMP. It is important to remark that the single mutant *apn1Δ* shows also a significant sensitivity to both compounds (Fig 1E and 2E). In addition, for 5-FU, the sensitivity of the double mutant *ntg1Δntg2Δ* comes from the deletion of *NTG2*, since *ntg1Δ* alone is not sensitive by itself (Figure 1E). *Ntg1* and *Ntg2* remove oxidized purines and pyrimidines with not identical substrate specificities; they differ by its localization – *Ntg1* is found in the nucleus and mitochondria while *Ntg2* seems to act only in the nucleus (Gellon *et al.*, 2001;

Meadows *et al.*, 2003; Boiteux and Guillet, 2004). Moreover, *Ntg1* is damage inducible whereas *Ntg2* is constitutively expressed (Gellon *et al.*, 2001). In this way, we suggest that *Ntg2* could have more specificity for removal fluoronucleotides than *Ntg1*, since there are significant differences in survival. The fact that *ntg1Δntg2Δ* double mutant was sensitive to FdUMP (Fig. 2E) may indicate that both *Ntg1* and *Ntg2* proteins are important DNA glycosilases to recognize the FdUMP-induced lesions. This can explain the resistance of the single mutants to the treatment to this agent (Fig. 2E), meaning that the absence of only of these proteins can be compensated by either its partner or by another DNA repair pathway.

Interestingly, *rad27Δ* and *ung1Δ* did not presented significant sensibility, for both drugs, when compared to the WT (Fig. 1A and Fig. 2A). *Ung1*, uracil DNA glycosilase, is responsible to remove the uracil in the DNA, generating one AP site; in its absence, the uracil remains in the DNA, what do not confer so high toxicity when compared to AP sites (Tinkelenberg *et al.*, 2002; Seiple *et al.*, 2006). *Rad27*, a flap endonuclease in long-patch base excision repair, is related to remove 5' deoxyribose phosphate (dRP) blocking groups and generates a gap of nucleotides; its absence leads to accumulation of 5'dRP blocked sites in the DNA. The 5'dRP accumulated is probably less toxic than one gap of nucleotides, what could explain the absence of pronounced toxicity in this deleted strain (Seiple *et al.*, 2006).

The *rad1Δ* and *rad10Δ* (DNA endonuclease subunit of nucleotide excision repair factor 1 that cleaves single stranded DNA during NER and double-strand break repair) (Prakash and Prakash, 2000) (Fig. 1C and Fig 2C), *rev3Δ* (catalic subunit of DNA polymerase zeta, which is involved in DNA repair and TLS) (Gan *et al.*, 2008), *rev1Δ* (deoxycytidyl transferase that forms a complex with the subunits DNA polymerase ζ, participates in abasic sites repair) (Gan *et al.*, 2008) (Fig. 1B and Fig. 2B), *rad50Δ* (subunit

of MRX complex, process double-strand breaks by NHEJ) (Pastwa and Blasiak, 2003) and *rad52* Δ (involved in the repair of double-strand breaks by HR) (Li and Heyer, 2008) (Fig. 1D and Fig. 2D) did not present significant sensitivity for both drugs, when compared to WT. These data suggest that NER, HR, TLS and NHEJ pathways alone, investigated by using single mutants, are not decisive in repairing fluoronucleotides and uracil misincorporated into DNA, as BER.

Damaged and misincorporated bases are removed by DNA-glycosylases from BER, what results in AP sites. These AP sites could be: (i) repaired by BER or NER, both fidelity (error free) pathways; (ii) tolerated by HR or TLS, fidelity and mutagenic pathways respectively; or (iii) if the damaged is not repaired or tolerated, it leads to cell death (for review, see Boiteux and Guillet, 2004). Our model with quadruple mutants allows us to understand the overlay of DNA repair pathways of AP sites, since our strains are defective in *Apn1* and important genes from NER, HR and TLS. Our data showed that the quadruple mutant involving BER and NER, *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rad1* Δ , as well as BER and TLS, *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rev3* Δ showed a weak sensitivity after treatment with 5-FU (Fig. 1F). However, for treatment with FdUMP they show the same sensitivity to that observed for its isogenic WT strain (Fig. 2F). These results lead us to suggest that NER and TLS have only a minority role in the repair of 5-FU induced lesions. Interestingly, after treatment with 5-FU the quadruple mutant *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rad52* Δ showed an important sensitivity (Fig. 1F), indicating that the pathway involving BER and HR are important to repair fluoronucleotides. However, the same did not occur for FdUMP (Fig. 2F). Thus, BER pathway could initiate the repair, recognizing and removing fluoronucleotides derived from 5-FU lesions by *Apn1*, *Ntg2* proteins, leading to DNA single and double strand breaks. These intermediate repair substrates could be channeled to homologous

recombination repair pathway (Type RAD52), its known to repair double strand breaks induced by different genotoxic agents (for review, see Aylon e Kupiec, 2004; Dudás e Chovanec, 2004; Li e Heyer, 2008). This is in accordance to our results that demonstrated that *rad52Δ* single mutant alone is not sensitive when compared to its WT, which suggests that 5-FU does not induce double-strand breaks by itself – the breaks are result of BER repair machinery (Fig. 1D).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not possess the enzyme thymidine kinase, responsible for the conversion of 5-FU in FdUMP (Ladner, 2001). In this way, we believed that cytotoxicity provided from treatments with 5-FU is related only to fluoronucleotides incorporation only, while treatments with FdUMP would result in an increase of uracil misincorporation. This difference in the substrate, fluoronucleotides or uracil, could influence in the DNA repair pathway involved. In this respect, our results from Fig 2E and 2F clearly showed that the damages induced by FdUMP are preferentially repaired by BER, but one can not exclude a possible involvement of mismatch repair (MMR) pathway. Indeed, we have recently shown that FdUMP induces the cell cycle arrest in G2 in human SW620 colon adenocarcinoma cell line which is proficient in MMR (Matuo *et al.*, 2008 in preparation).

In mammalian cells it was reported that lesion by 5-FU could be repaired by two DNA repair pathways: BER and mismatch repair (MMR), depending on the type of DNA damage. Lesions 5-FU:A and U:A could be repaired by BER, meanwhile 5-FU:G would be removed by MMR (Meyers *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2007). However, Seiple *et al.* (2006) investigated the deletion of Msh2 in *Saccharomyces cerevisiae* and this MMR-deficient strain did not present differences in survival when compared to its WT

after treatments with 5-FU. More investigations remain still necessary in order to better comprehend the MMR role in repairing lesions by 5-FU in yeast.

The comprehension of repair mechanisms of anticancer drugs is very important to predict if one treatment will be successful or not, once the damage induced by these chemicals could be repaired so fast that reduce the clinical efficiency. Besides, the development of inhibitors that accumulate toxic intermediates generated during the repair, as abasic sites, would increase the cytotoxic effect and bring clinical benefits.

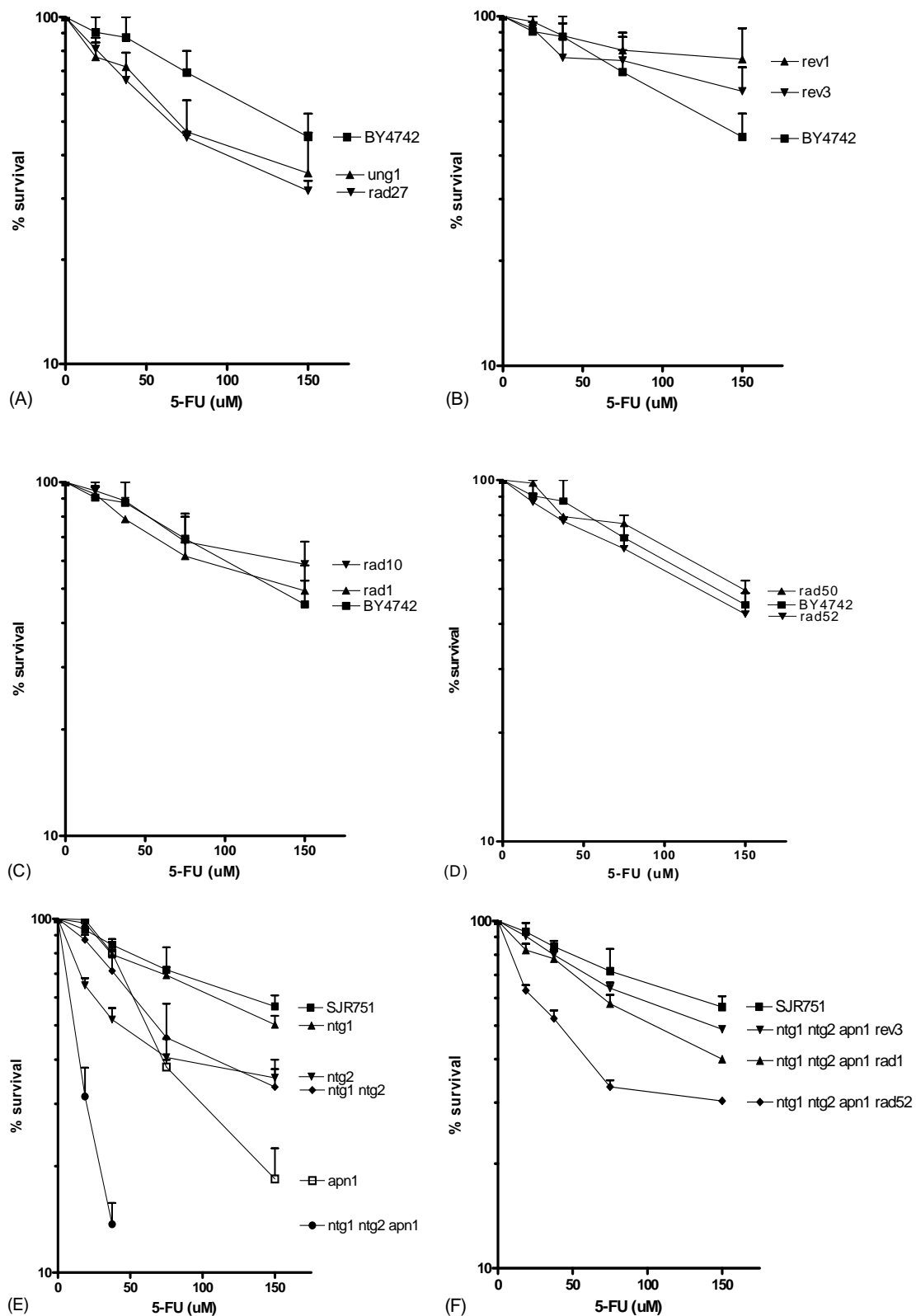


Figure 1: Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in (A) BER, (B) TLS, (C) NER, (D) HR and NHEJ, (E) BER glycosylases, AP lyases and endonuclease single, double and triple mutants, (F) triple of BER in combination with NER, HR or TLS; after treatment with different concentrations of 5-FU.

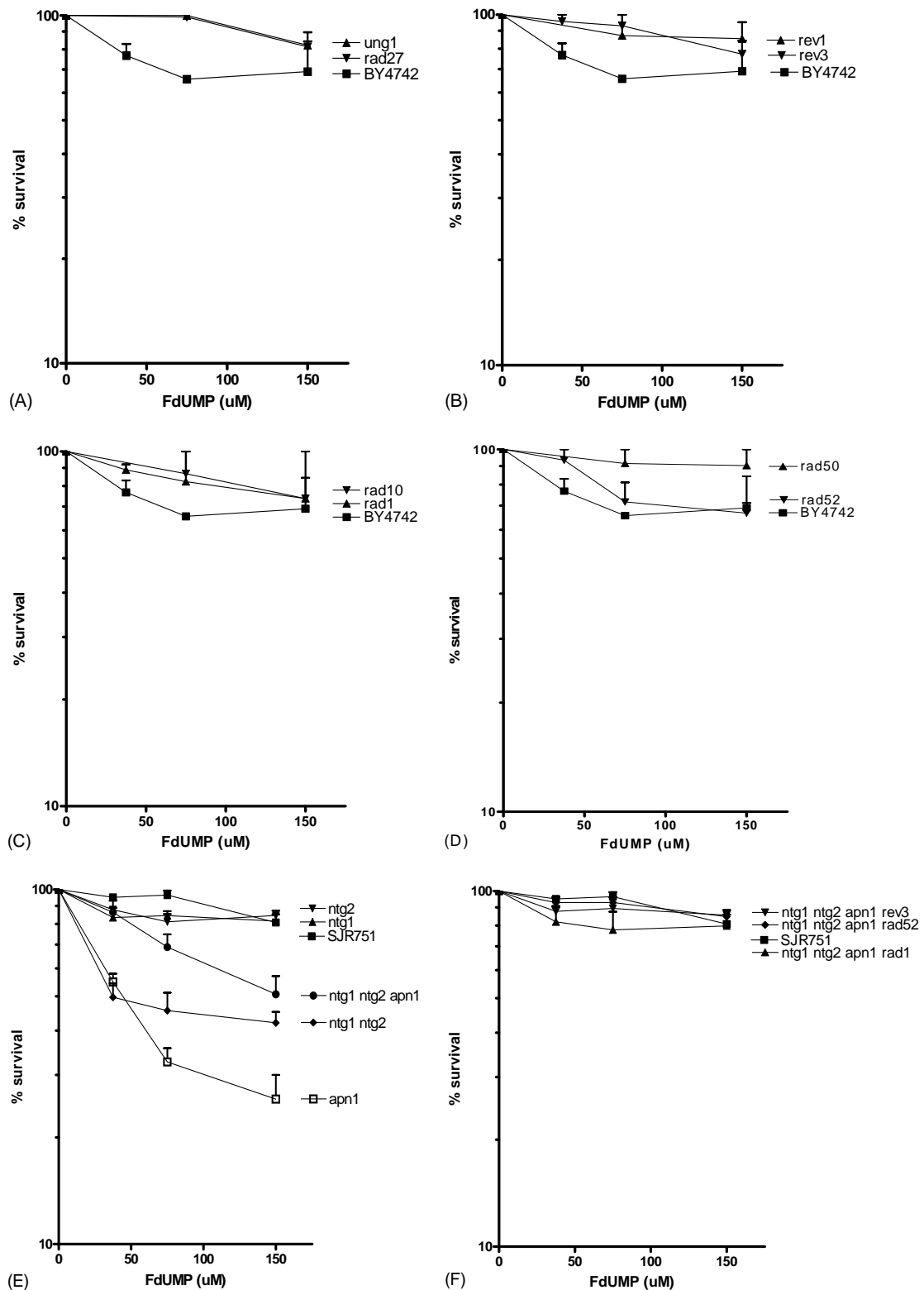


Figure 2: Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in (A) BER, (B) TLS, (C) NER, (D) HR and NHEJ, (E) BER glycosylases, AP lyases and endonuclease single, double and triple mutants, (F) triple of BER in combination with NER, HR or TLS; after treatment with different concentrations of FdUMP.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS, GENOTOX-Royal Institute - Biotechnology Center – University of Rio Grande do Sul and Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Matuo R. held a CNPq fellowship and is a Masters student from UFRGS and Escargueil A.E. held a CAPES fellowship for visiting professorship.

References

- Andersen S, Heine T, Sneve R, König I, Krokan HE, Epe B and Nilsen H (2004) Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 26:547-555.
- Aylon Y and Kupiec M (2004) New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* 566:231-248.
- Boiteux S and Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3:1-12.
- De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL and Stokke T (2006) Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) and 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer* 5:1-25.
- Dudás A and Chovanec M (2004) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 566:131-167.
- Fisher F, Baerenfaller K and Jiricny J (2007) 5-fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterol* 133:1858-1868.
- Gan GN, Wittschieben JP, Wittschieben BO and Wood RD (2008) DNA polymerase zeta in higher eukaryotes. *Cell Res* 18:174-183.
- Gellon L, Barbey R, van der Kemp AP, Thomas D and Boiteux S (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and the nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265:1087-1096.
- Ghoshal K and Jacob ST (1994) Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 54:632-636.
- Grem JL (1997) Mechanisms of action and modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol* 7:249-259.
- Ladner RD (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Peptides Sci* 2:361-370.
- Li X and Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18:99-113.

- Meadows KL, Song B and Doetsch PW (2003) Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Res* 31:5560-5567.
- Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD and Boothman DA (2003) A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene* 22:7376-7388.
- Meyers M, Wagner MW, Mazurek A, Schmutte C, Fishel R and Boothman (2005) DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem* 280:5516-5526.
- Morio A, Miyamoto H, Izumi H, Futagawa T, Oh T, Yamazaki A and Konno H (2004) Enhanced induction of apoptosis in lung adenocarcinoma after preoperative chemotherapy with tegafur and uracil. *Surg Today* 34:822-827.
- Pastwa E and Blasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Polonica* 50:891-908.
- Prakash S and Prakash L (2000) Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* 451:13-24.
- Rahman Z, Kohli K, Khar RK, Ali M, Charoo NA and Shamsheer AAA (2006) Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS PharmSciTech* 7.
- Rosen B, Rothman F and Weighert MG (1969) Miscoding caused by 5-fluorouracil. *J Mol Biol* 44:363-375.
- Santi DV and Hardy LW (1987) Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5) methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26:8599-8606.
- Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M and Stivers JT (2006) Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acid Res* 34:140-151.
- Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW and Jinks-Robertson (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:2929-2935.
- Tinkelenberg BA, Hansbury MJ and Ladner RD (2002) dUTPase and uracil-glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 62:4909-4915.
- Tokunaga E, Oda S, Fukushima M, Maehara Y and Sugimachi K (2000) Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 36:1998-2006.

III. DISCUSSÃO

Muitos agentes antineoplásicos que são empregados na clínica, não foram completamente estudados a fim de se compreender os mecanismos de citotoxicidade pelos quais atuam. As investigações aprofundadas de como estas drogas inibem a progressão tumoral e como as células normais respondem a tais tratamentos, torna-se de extrema importância, uma vez que contribuem para protocolos mais eficazes e futuramente, redução significativa de efeitos colaterais.

A atividade esperada de um agente antineoplásico citotóxico é a indução de apoptose nas células tumorais (Kaufmann e Earnshaw, 2000; Johnstone *et al.*, 2002; Werner e Steinfeld, 2007). O quimioterápico, através de diferentes mecanismos de citotoxicidade causaria danos no DNA. Estas lesões desencadeariam paradas do ciclo celular, na tentativa de se reparar o dano (Meyers *et al.*, 2005). Este poderia ser reparado e as células poderiam continuar seus ciclos celulares normalmente. No entanto, caso o dano seja excessivo, as células podem ser marcadas para apoptose, o que é esperado em um tratamento clínico com antineoplásicos. Porém, estas células podem não entrar em apoptose, devido à falhas durante este processo, resultando na seleção destas, o que aumentaria a carcinogênese (Figura 11) (Berstein *et al.*, 2002).

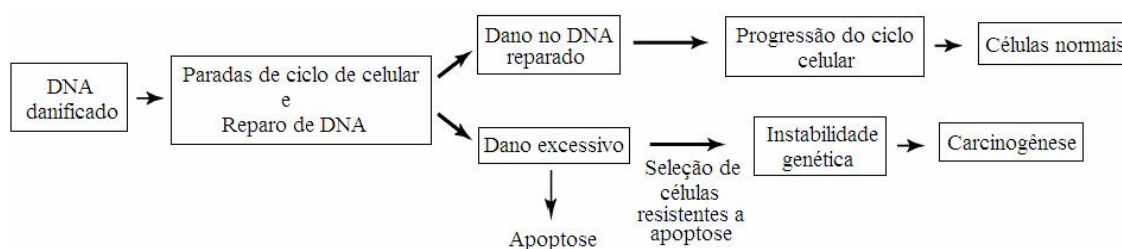


Figura 11: Processos que sucedem o DNA danificado: parada de ciclo celular e reparação, indução de apoptose ou carcinogênese. Adaptado de Berstein *et al.* (2002).

O antineoplásico 5-fluorouracil tem sido empregado na clínica desde 1957, nos tratamentos de câncer de cólon, mama, cabeça e pescoço (Noordhuis *et al.*, 2004). O 5-FU possui mecanismos de citotoxicidade baseados na incorporação errônea de nucleotídeos análogos ao uracil que contêm flúor no DNA e RNA, e a inibição da enzima TS, via FdUMP. Entretanto, muitos autores acreditam que o principal mecanismo seja pela atividade do metabólito FdUMP (Grem, 2000; Grivicich *et al.*, 2007).

No presente estudo investigamos os mecanismos de citotoxicidade do 5-FU e do seu metabólito FdUMP, em relação a paradas de ciclo celular, genotoxicidade, indução de quebras de fita dupla por γ H2AX, e apoptose em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620. Analisou-se também as vias de reparação de DNA envolvidas na eliminação das lesões geradas por estes agentes em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados apresentados no Capítulo I mostram que as linhagens de células SW620 tratadas tanto 5-FU como FdUMP induzem morte celular por apoptose. No entanto, ao observar o ciclo celular, verificou-se que 5-FU leva a parada em G1, enquanto FdUMP desencadeia parada em G2 após 48h de tratamento. Com o objetivo de investigar as causas destas paradas de ciclo celular, foram empregados o teste cometa, a fosforilação da histona H2AX e a frequência de micronúcleos. Nossos resultados mostraram que tanto o 5-FU como o FdUMP induzem quebras globais no genoma, SSBs e formação de micronúcleos, o que não explica as diferenças de parada de ciclo celular. As DSBs evidenciadas pelo ensaio de γ H2AX após tratamento com 5-FU seriam consequência da indução de apoptose, e não pela atividade direta da droga. Logo, estes resultados sugerem que a diferença no bloqueio do ciclo celular por 5-FU e FdUMP depende do tipo de lesão originado pelas drogas e as vias de reparação de DNA que são empregadas para reconhecê-las.

No Capítulo I foram evidenciadas quebras de DNA após tratamento com fluoropirimidinas. Diferentes autores relacionam estas quebras à falhas durante a reparação das bases errôneas (Seiple *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2008), indução de apoptose (Luo *et al.*, 2008), ou ainda pelo bloqueio da enzima topoisomerase 1 (Top1) em lesões no DNA como sítios AP, uracil e fluoropirimidinas incorporadas erroneamente (Liao *et al.*, 2005).

Os resultados do Capítulo I nos permitiram sugerir que as diferenças na progressão do ciclo celular após tratamento com 5-FU e FdUMP estão possivelmente relacionadas com a maquinaria de reparo envolvida no reconhecimento e processamento das lesões geradas pelos agentes. Com o objetivo de se investigar como as vias de reparação atuam nas lesões induzidas por ambas as substâncias, empregou-se simples, duplos e triplos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, e quádruplos mutantes deficientes em BER e NER, HR ou TLS (Capítulo II).

Nossos resultados mostraram que o simples mutante *apn1Δ* foi mais sensível que os duplos mutantes *ntg1Δntg2Δ* e triplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δ* aos tratamentos com 5-FU e FdUMP. Apn1 é a principal endonuclease de *S. cerevisiae* responsável pelo processamento de sítios AP gerados pela remoção de bases danificadas ou errôneas, e na sua ausência, ocorre o acúmulo desses sítios, os quais são altamente tóxicos à célula, uma vez que podem ser convertidos em quebras de DNA (Boiteux and Guillet, 2004; Seiple *et al.*, 2006). Ntg1 e Ntg2 possuem atividades de DNA glicosilase que remove purinas e pirimidinas danificadas, gerando sítios AP, e de liases – que processam os sítios AP (Gellon *et al.*, 2001; Meadows *et al.*, 2003; Boiteux and Guillet, 2004). No entanto, Ntg1 e Ntg2 apresentam especificidades de substrato diferentes; diferenciam-se pela localização – Ntg1 é encontrada no núcleo e mitocôndria, enquanto que Ntg2 atua somente no núcleo (Gellon *et al.*, 2001; Meadows *et al.*, 2003; Boiteux and Guillet, 2004). Observou-se que a

glicosilase Ntg2 poderia ter maior especificidade na remoção de fluoronucleotídeos que a Ntg1, uma vez que houve diferenças significativas na sobrevivência após tratamento com 5-FU (Fig 1F, Capítulo II). O duplo mutante *ntg1Δntg2Δ* mostrou alta sensibilidade ao tratamento com FdUMP, o que indica que ambas as proteínas, Ntg1 e Ntg2, são importantes para o reconhecimento das lesões induzidas por este agente.

Além destas glicosilases, investigou-se a atividade da Ung1, uracil glicosilase, que remove o uracil incorporado no DNA, gerando sítios AP. Neste caso, observou-se que sensibilidade deste mutante não foi alterada de maneira significativa (Fig 1A, Capítulo II), o que pode ser explicado pelo fato de que na ausência de Ung1, o uracil permanece intacto no DNA o que não é tão tóxico quanto a presença de sítios AP (Tinkelenberg *et al.*, 2002; Seiple *et al.*, 2006).

Dados referentes à investigação da participação do NER (linhagens *rad1Δ* e *rad10Δ*), TLS (linhagens *rev1Δ* e *rev3Δ*) e NHEJ (linhagem *rad50Δ*) no reparo das lesões por 5-FU e FdUMP, mostraram que não houve diferenças significativas quando comparadas com a linhagem selvagem respectiva, o que sugere que estas vias não sejam essenciais no processamento destas lesões. A ausência de sensibilidade dos mutantes *rad1Δ* e *rad10Δ* pode ser explicada pelo fato de que o 5-FU é análogo ao uracil, a sua incorporação no DNA não gera grandes modificações na estrutura do DNA (Meyers *et al.*, 2003), o que é necessário para o reconhecimento pelo NER (Prakash e Prakash, 2000; van Hoffen *et al.*, 2003). Na presença de lesões que bloqueiam a síntese de DNA, pode haver a participação da via TLS (Gan *et al.*, 2008), entretanto, nossos resultados revelaram que tanto 5-FU como FdUMP provavelmente não sejam reparados por esta via, uma vez que *rev1Δ* e *rev3Δ* não se mostraram mais sensíveis. Nossos resultados (Capítulo I) mostraram que as duas drogas induzem SSBs apenas, o que justifica a ausência da participação das

vias HR e NHEJ, uma vez que o substrato para ambas as vias são principalmente DSBs (Weterings e Chen, 2007; Li e Heyer, 2008).

Ao estudar a sobreposição das vias de reparação empregando quádruplos mutantes, verificou-se que o *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* apresentou uma sensibilidade significativa quando tratado com 5-FU. Este resultado sugere que os fluoronucleotídeos incorporados erroneamente, em resposta ao tratamento com 5-FU, podem ser reconhecidos por DNA glicosilases do BER, como Ung1 e Ntg2, os quais removem as bases errôneas e geram sítios AP. Estes sítios, por sua vez, são removidos principalmente pela endonuclease *Apn1*, no entanto, quando ocorrem falhas no processamento destes sítios, são formadas quebras de fitas simples e duplas de DNA (Boiteux e Guillet, 2004; Friedberg *et al.*, 2006). Estas quebras de fita dupla originadas após a atividade do sistema de reparação BER, podem ser direcionadas a uma outra via de reparação, a HR (para revisão, ver Aylon e Kupiec, 2004; Dudás e Chovanec, 2004; Li e Heyer, 2008). Estes resultados corroboram com os obtidos nos experimentos com simples mutante em HR (*rad52Δ*), que não apresentou diferenças significativas na sensibilidade, indicando que o 5-FU não leva à formação de DSBs diretamente e que as mesmas são conseqüências da ação prévia do BER.

Em relação aos quádruplos mutantes, *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ*, foi observada uma moderada sensibilidade dos mesmos, após tratamento com 5-FU. No entanto, para o FdUMP, as linhagens mostraram o mesmo padrão de sensibilidade que a respectiva selvagem. Estes resultados indicam que as vias NER e TLS possuem um papel minoritário no reparo de lesões induzidas por 5-FU.

Ao contrário do observado com 5-FU, o tratamento com FdUMP não alterou a sensibilidade do mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*. Este resultado sugere que as lesões

geradas por FdUMP, ao serem processadas pelas glicosilases Ntg1 e Ntg2 e AP endonuclease Apn1 do BER, possivelmente não geram quebras de fita dupla.

Nossos resultados demonstraram que a atividade do BER é de extrema importância no reparo das lesões geradas tanto por 5-FU como por FdUMP. Além disso, recentemente Meyers *et al.* (2003) e Fisher *et al.* (2007) mostraram que os fluoronucleotídeos podem ser reparados por BER ou MMR em células humanas, dependendo do tipo de emparelhamento entre as bases, enquanto que o uracil seria reparado por BER. Os emparelhamentos 5-FU:A, que não causam grande distorção no DNA seriam reparados por BER, enquanto que 5-FU:G que é mais mutagênico, seria reparado via MMR. Vale ressaltar que o desbalanço do *pool* de nucleotídeos favorece a re-incorporação de fluoronucleotídeos durante a reparação por BER e MMR, uma vez que a concentração de dUTP se encontra elevada, e conseqüentemente há formação de mais quebras (Ladner, 2001; Meyers *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2005; Longley *et al.*, 2006).

Levando em consideração estas informações, juntamente com o fato de que o FdUMP induz uma parada de ciclo celular em G2 (Fig. 3, Capítulo I) em células de adenocarcinoma de cólon humano (SW620), não se pode descartar a possível participação do MMR, uma via de reparação pós-replicativa (Ladner, 2001), no reparo das lesões geradas pelo FdUMP.

Estudos empregando FdUMP em *Saccharomyces cerevisiae* não foram previamente relatados na literatura. Para que o 5-FU seja convertido em FdUMP, é necessária a atividade da enzima timidina cinase (TK). No entanto, a levedura *S. cerevisiae* não possui TK (Ladner, 2001), o que põe em dúvida se no tratamento com 5-FU ocorre a formação de FdUMP. Desta maneira, acreditamos que os danos gerados por 5-FU, neste sistema

biológico, seriam decorrentes principalmente da incorporação de fluoronucleotídeos no DNA, e as lesões por FdUMP, seriam decorrentes da incorporação do uracil no DNA.

O conjunto de resultados obtido neste trabalho sugere que as SSBs formadas após tratamento com 5-FU em células de adenocarcinoma de cólon humano estejam relacionadas à tentativa de reparação de bases incorporadas erroneamente por BER. Falhas no BER poderiam gerar DSBs, que por sua vez seriam reparadas por HR, como visto na sensibilidade do quádruplo mutante de *S. cerevisiae* *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*. Em relação ao FdUMP, as SSBs seriam resultantes da reparação por BER e durante este processo, não seriam formadas DSBs. Soma-se a estes resultados, dados da literatura que explicam as quebras de DNA como sendo desencadeadas pela inibição de topoisomerase (Liao *et al.*, 2005) e a participação do MMR (Meyers *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2007). Na Figura 12 é sugerido um modelo do envolvimento das vias de reparação de DNA nas lesões geradas por 5-FU e FdUMP.

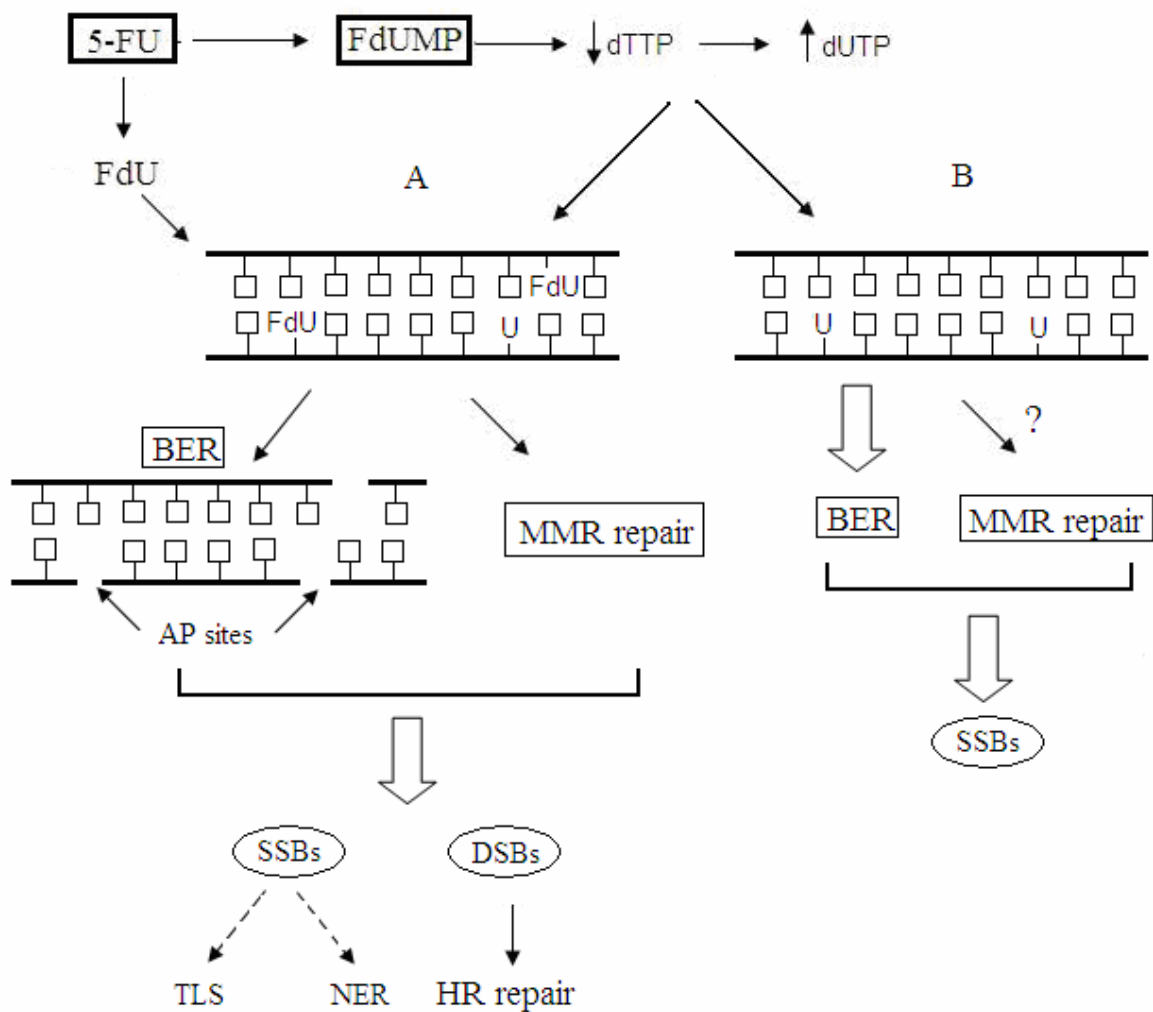


Figura 12: Participação das vias de reparação de DNA nos danos gerados por 5-FU e FdUMP. O 5-FU pode ser convertido a fluoronucleotídeos (FdU) ou metabolizado em FdUMP. O FdUMP por sua vez, leva à inibição da TS e conseqüentemente ocorre o desbalanço do *pool* de nucleotídeos. Coluna A: Tanto FdU como uracil podem ser incorporados no DNA após tratamento com 5-FU. Dependendo do tipo de pareamento, as bases errôneas serão reparadas por diferentes maquinarias: BER reconhece FdU:A e U:A, enquanto que FdU:G é reconhecido pelo MMR. Falhas nestes processos desencadeiam SSBs e DSBs. Uma pequena parcela das SSBs poderia ser reparada por TLS e NER, enquanto que as DSBs seriam processadas via HR. Coluna B: O FdUMP levaria a incorporação de uracil no DNA, que é reparado preferencialmente por BER, porém a participação do MMR não pode ser descartada. Falhas no BER levariam à formação do SSBs.

IV. CONCLUSÃO

1. Conclusão Geral

Com este estudo, conclui-se que tanto 5-FU quanto FdUMP são agentes citotóxicos que induzem morte celular por apoptose e geram quebras no DNA em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620. Além disso, a via BER mostrou-se importante na remoção de lesões geradas por ambas as drogas.

2. Conclusões específicas

- O antineoplásico 5-FU induz apoptose em células SW620, determinado pelo ensaio de caspase 3/7.
- O 5-FU desencadeia parada de ciclo celular em G1 em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620.
- O 5-FU gera quebras de DNA, determinados por teste cometa e micronúcleos em células SW620.
- A formação de DSBs, evidenciadas por γ H2AX após tratamento de 12h com 5-FU, é resultado de apoptose.
- O metabólito FdUMP leva a alta indução de apoptose em células SW620 em tratamentos prolongados (48h).
- O FdUMP provoca parada de ciclo celular em G2 em células de adenocarcinoma de cólon humano SW620.

- O tratamento com FdUMP resulta em quebras simples de DNA, determinadas pelo teste cometa alcalino e induz micronúcleos em células SW620.
- O FdUMP não leva a formação de DSBs, evidenciado por γ H2AX em SW620.
- A endonuclease *Apn1*, envolvida na via BER de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrou ser importante no reparo de lesões geradas por 5-FU e FdUMP, uma vez que os mutantes *apn1* Δ e *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ foram altamente sensíveis.
- A DNA glicosilase Ntg2 está envolvida no reconhecimento das lesões causadas por 5-FU, enquanto os danos induzidos por FdUMP são reconhecidos por ambas glicosilases Ntg1 e Ntg2.
- A deleção de *Ung1* não alterou de maneira significativa a sobrevivência dos mutantes após tratamento com 5-FU e FdUMP.
- Mutantes simples em NER (*rad1* Δ e *rad10* Δ), HR (*rad52* Δ), NHEJ (*rad50* Δ) e TLS (*rev1* Δ e *rev3* Δ) não mostraram sensibilidade frente tratamentos com 5-FU e FdUMP.
- A sensibilidade do quádruplo mutante *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rad52* Δ após tratamento com 5-FU sugere que a atividade do BER possivelmente gera DSBs que são reparadas por HR.
- Os quádruplos mutantes *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rad1* Δ e *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rev3* Δ não foram sensíveis ao FdUMP, porém apresentaram sensibilidade moderada ao 5-FU.
- O FdUMP não diminui a sobrevivência do mutante *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ *rad52* Δ .

V. PERSPECTIVAS

O conjunto de dados obtidos neste trabalho nos permitiu compreender os mecanismos de citotoxicidade do antineoplásico 5-FU e do seu metabólito FdUMP e as vias de reparação de DNA envolvidas nas lesões geradas por estes agentes. Desta maneira, as perspectivas deste estudo podem ser apontadas:

- Investigar a participação do sistema de reparação de bases mal-emparelhadas - MMR em *Saccharomyces cerevisiae* no reparo das lesões geradas por 5-FU e FdUMP;
- Verificar a indução de mutagênese *forward* em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em reparo tratadas com 5-FU e FdUMP;
- Investigar se ocorrem paradas de ciclo celular em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em reparo após tratamento com 5-FU e FdUMP;
- Avaliar a participação de outros fatores que influenciam na reparação das lesões geradas por 5-FU e FdUMP, como o remodelamento da cromatina;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya N, Johnson RE, Prakash S and Prakash L (2006) Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol Cell Biol* 26:9555-9563.
- Almeida KH and Sobol RW (2007) A unified view of base excision repair: lesion dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* 6:695-711.
- Andressoo JO and Hoeijmakers JHJ (2005) Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res* 577:179-194.
- Andressoo JO, Hoeijmakers JHJ and Mitchell JR (2006) Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle* 5:2886-2888.
- Aquilina G and Bignami M (2001) Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J Cell Physiol* 187:145-154.
- Armour CD and Lum PY (2005) From drug to protein: using yeast genetics for high-throughput target discovery. *Curr Opin Chem Biol* 9:20-24.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1995) *Curr Protocols in Mol Biol* New York: Wiley.
- Aylon Y and Kupiec M (2004) New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* 566:231-248.
- Benson III AB and Goldberg RM (2003) Optimal use of the combination of irinotecan and 5-fluorouracil. *Semin Oncol* 30:68-77.
- Bernstein C, Berstein H, Payne CM and Garewal H (2002) DNA repair/pro apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511:145-178.
- Boeira JM, Viana AF, Picada JN and Henriques JAP (2002) Genotoxic and recombinogenic activities of the β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 500:39-48.
- Boiteux S and Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3:1-12.
- Braithwaite E, Wu X and Wang Z (1999) Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat Res* 424:207-219.

- Brendel M and Henriques JAP (2001) The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat Res* 489:79-96.
- Brendel M, Bonatto D, Strauss M, Revers LF, Pugartnik C, Saffi J and Henriques JAP (2003) Role of *PSO* genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 544:179-193.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S and Speit G (2005) The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20:245-254.
- Broomfield S, Hryciw T and Xiao W (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486:167-184.
- Brozmanová J, Dudás A and Henriques JA (2001) Repair of oxidative DNA damage an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma* 48:85-93.
- Brugmans L, Kannar R and Essers J (2007) Analysis of DNA strand-breaks repair pathways in mice. *Mutat Res* 614:95-108.
- Brusick DJ (1987) Principles of genetic toxicology. 2 ed. New York: Plenum Press. 284p.
- Buermeyer A, Deschenes S, Baker S and Liskay (1999) Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 33:533-564.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M and Hartmann A (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627, 31-35.
- Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB and Boland R (1999) Mismatch repair proficiency and *in vitro* response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 117:123-131.
- Cassidy J, Douillard JY, Twelves C, McKendrick JJ, Scheithauer W, Bustová I, Johnston PG, Lesniewski-Kmak K, Jelic S, Fountzilas G, Coxon F, Díaz-Rubio E, Maughan TS, Malzyner A, Bertetto O, Beham A, Figuer A, Dufour P, Patel KK, Cowell W and Garrison LP (2006) Pharmacoeconomic analysis of adjuvant oral capecitabine vs intravenous 5-FU/LV in Dukes' C colon cancer: the X-ACT trial. *Br J Cancer* 94:1122-1129.
- Chan KKL, Zhang QM and Dianov GL (2006) Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. *Mutagenesis* 21:173-178.
- Chlebowicz E and Jachymczyk WJ (1979) Repair of MMS-induced DNA double-strand breaks in haploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*, which requires the presence of a duplicate genome. *Mol Gen Genet* 167:279-286.

- Chung HW, Kang SJ and Kim SY (2002) A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutat Res* 516:49-56.
- Claverys PJ and Lacks SA (1986) Lacks, heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* 50:133-165.
- Cleaver JE (2005) Cancer in *xeroderma pigmentosum* and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5:564-573.
- Cline SD and Hanawalt PC (2003) Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:361-372.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261.
- Collins AR (2007) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*, *in press*.
- Costa RM, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H and Menck CF (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083-1099.
- Cunha KS and Lehmann M (2003) Drogas anticancer e seus efeitos genotóxicos. In: Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. 424p.
- David SS, O'Shea and Kundu S (2007) Base excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447:941-950.
- De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL and Stokke T (2006) Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) and 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer* 5:1-25.
- De Gramont A, Figer A, Seymour M (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2938-2947.
- De Santis LP, Garcia CL, Balajee AS, Latini P, Pichierri P, Nikaido O, Stefanini M and Palitti F (2002) Transcription coupled repair efficiency determines the cell cycle progression and apoptosis after UV exposure in hamster cells. *DNA Repair* 1:209-223.
- Di Paolo A, Danesi R and Del Tacca M (2004) Pharmacogenetics of neoplastic diseases: new trends. *Pharmacol Res* 49:331-342.
- Dizdaroglu M (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* 591:45-59.

- Dudás A and Chovanec M (2004) Double strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 566:131-167.
- Dudasová Z, Dudás A and Chovanec M (2004) Non-homologous end joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Reviews* 28:581-601.
- Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen A and Henriques JAP (2008) What histone code for DNA repair? *Mutat Res* accepted for publication.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M and Mersch-Sundermann V (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566:209-229.
- Fenech M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 392:11-18.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81-95.
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600:58-66.
- Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Bigatti MP, Bolognesi C, Cao J, De Luca G, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hadjidekova VV, Hreria P, Jaworska A, Joksic G, Krishnaja AP, Lee TK, Martelli A, McKay MJ, Migliori L, Mirkova E, Müller WU, Odagiri Y, Orsieri T, Scarfi MR, Silva MJ, Sofuni T, Surralles J, Trenta G, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A (2003) Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res* 534:45-64.
- Ferrari I (1991) Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética. p.107-112.
- Fischer F, Baerenfaller K and Jiricny J (2007) 5-fluorouracil is efficiently removed from DNA by Base Excision Repair and Mismatch Repair Systems. *Gastroenterol* 133:1858-1868.
- Fishel R (1998) Mismatch repair, molecular switches and signal transduction. *Genes Dev* 12:2096-2101.
- Flores-Rozas H and Kolodner RD (2000) Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 25:196-200.
- Forsburg SL (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev* 2:659-668.

- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA and Ellenberger T (2006) DNA repair and Mutagenesis. 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
- Gaivão I, Piasek A, Brevik A, Shapohnikov S and Collins AR (2007) Comet assay-based methods for measuring DNA repair *in vitro*; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol in press*.
- Gallego MP and Sarasin A (2003) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. *Biochimie* 85:1073-1082.
- Gan GN, Wittschieben JP, Wittschieben BO and Wood RD (2008) DNA polymerase zeta in higher eukaryotes. *Cell Res* 18:174-183.
- Garriot ML, Phelps JB and Hoffman WP (2002) A protocol for the *in vitro* micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat Res* 517:123-134.
- Gay M, Montaña AM, Moreno V, Prieto MJ, Pérez JM and Alonso C (2006) Studies of interaction of trichloro $\{\eta^2\text{-cis-N,N-dimethyl-1-[6-(N',N'-dimethyl-ammoniummethyl)-cyclohex-3-ene-1-yl]-methyl-ammonium}\}$ platinum(II) chloride with DNA: effects on secondary and tertiary structures of DNA. Cytotoxic assays on human ovarian cancer cell lines, resistant and non-resistant to cisplatin. *Bioorg Med Chem* 14:1565-1572.
- Gellon L, Barbey PA, van der Kemp, Thomas D and Boiteux S (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and the nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265:1087-1096.
- Giachetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Lotourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam S, Misset JL and Lévi F (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:136-147.
- Gillet LCJ and Schärer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 106:253-276.
- Goodman MF (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 71:17-50.
- Goshal K and Jacob ST (1994) Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts of lymphosarcoma cells treated with 5-FU. *Cancer Res* 54:632-636.
- Grem JL (1997) Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol* 7:249-259.

- Grem JL (2000) 5-fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs* 18:299-313.
- Grilley M, Welsh KM, Su SS and Modrich P (1984) Isolation and characterization of *Escherichia coli* MutL gene product. *J Biol Chem* 264:1000-1004.
- Grivicich I, Mans DRA, Peters GJ and Schwartzmann G (2001) Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Braz J Med Biol Res* 34:1087-1103.
- Grivicich I, Regner A, Rocha AB, Grass LB, Alves PAG, Kayser GB, Schwartzmann G and Henriques JAP (2005) Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncol Res* 15:385-392.
- Grivicich I, Regner A, Zanoni C, Correa LP, Jotz GP, Henriques JAP, Schwartzmann G and Rocha AB (2007) Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. *Int J Colorectal Dis* 22:1201-1208.
- Güerci A, Liviác D and Marcos R (2007) Detection of excision repaired DNA damage in comet assay by using Ara-C and hydroxyurea in three different cell types. *Cell Biol Toxicol in press*.
- Haber JE (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24:271-275.
- Hanalwalt PC (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21:8949-8956.
- Harfe BD and Jinks-Robertson S (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 34:359-399.
- Harris SM, Mistry P, Freathy C, Brown JL and Charlton (2005) Antitumour activity of XR5944 *in vitro* and *in vivo* in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 92:722-728.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice RR (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay: 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18:45-51.
- Hartwell LH (2002) Yeast and cancer. *Biosci Rep* 22:373-394.
- Hedge ML, Hazra TK and Mitra S (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathways in mammalian cells. *Cell Res* 18:27-47.
- Herrick D and Kufe DW (1984) Lethality associated with incorporation of 5-fluorouracil into preribosomal RNA. *Mol Pharmacol* 26:135-140.

- Hoeijmakers JH (1993) Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 9:211-217.
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374,
- Hofseth LJ, Hussain SP and Harris CC (2004) p53:25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25:177-181.
- Hsieh P (2001) Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res* 486:71-87.
- Iamarcovai G, Botta A and Orsière T (2006) Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol Lett* 166:1-10.
- Imai K and Yamamoto H (2007) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis Adv Access in press*.
- Ishidate Jr M, Harnois MC and Sofuni T (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat Res* 195:151-213.
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V and Modrich (2006) DNA mismatch repair: function and mechanisms. *Chem Rev* 106:302-323.
- Jagannathan I, Cole HA and Hayes JJ (2006) Base excision repair in nucleosome substrates. *Chromosome Res* 14:27-37.
- Jeggo PA (1998a) DNA breakage and repair. In: Hall JC, Friedmann T, Dunlap JC, Giannelli F. *Advances in genetics* v.38. Academic Press. San Diego. p.185-218.
- Jeggo PA (1998b) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 150:S80-S91.
- Jiricny J (1998a) Replication errors: challenging the genome. *EMBO* 17:6427-6436.
- Jiricny J (1998b) Eukariotic mismatch repair: an update. *Mutat Res* 409:107-121.
- Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch repair system. *Nat Rev* 7:335-346
- Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164.
- Jun SH, Kim TG and Ban C (2006) DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J* 273:1609-1619.

- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol* 8:483-389.
- Kastan MB and Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-323.
- Kastan MB, Canman CE and Leonard CJ (1995) p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metast Rev* 14:3-15.
- Kaufmann SH and Earnshaw WC (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256:42-49.
- Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G and Krokan HE (2007) Uracil in the DNA – general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair* 6:505-516.
- Kirsch-Volders M and Fenech M (2001) Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16:51-58.
- Kleivi K, Teixeira MR, Eknaes M, Diep CB, Jakobsen KS, Hamelin R and Lothe RA (2004) Genome signatures of colon carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 155:119-131.
- Kolodner RD and Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9:89-96.
- Korsmeyer SJ (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet* 11:101-105.
- Kramer W, Kramer B, Williamson MS and Fogel S (1989) Cloning and nucleotide sequence of DNA mismatch repair gene PMS1 from *Saccharomyces cerevisiae*: homology of PMS1 to procaryotic MutL and HexB. *J Bacteriol* 171:5339-5346.
- Kroemer G (1997) The proto-oncogene *bcl-2* and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3:614-620.
- Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A and Grzesiuk E (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implications in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Polonica* 54:413-434.
- Kufe DW and Major PP (1981) 5-fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem* 256:9802-9805.
- Kumaravel TS and Jha AN (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutat Res* 605:7-16.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP and Jha AN (2007) Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol in press*.

- Kunkel TA and Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74:681-710.
- Kurtz JE, Dufour P, Duclos B, Bergerat JP and Exinger F (2004) *Saccharomyces cerevisiae*: an efficient tool and model system for anticancer research. *Bull Cancer* 91:133-139
- Ladner RD (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Peptides Sci* 2:361-370.
- Lahue RS, Au KG and Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245:160-164.
- Lane DP (1992) p53 the guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- Lawrence CW, Gibbs PE, Murante RS, Wang XD, Li Z, McManus TP, McGregor WG, Nelson RJ, Hinkle DC and Maher VM (2000) Roles of DNA polymerase zeta and Rev1 protein in eukaryotic mutagenesis and translesion replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:61-69.
- Lawrence CW and Maher VM (2001a) Eukaryotic mutagenesis and translesion replication dependent on DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Biochem Soc Trans* 29:187-191.
- Lawrence CW and Maher VM (2001b) Mutagenesis in eukaryotes dependent on DNA polymerase zeta and Rev1p. *Phil Trans R Soc Lond* 356:41-46.
- Lehmann AR (2005) Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* 579:873-876.
- Lehmann AR (2006) Translesion synthesis in mammalian cells. *Exp Cell Res* 312:2673-2676.
- Leibeling D, Laspe P and Emmert S (2006) Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Hist* 37:225-238.
- Lenz HJ, Manno DJ, Danenberg KD and Danenberg PV (1994) Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursors splicing. *J Biol Chem* 269:31962-31968.
- Letavayová L, Marková E, Hermanská K, Vlcková V, Vlasaková D, Chovanec M and Brozmanová J (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 5:602-610.
- Li X and Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18:99-113.

- Liao ZY, Sordet O, Zhang HL, Kohlhagen G, Antony S, Gmeiner WH and Pommier Y (2005) A novel polypyrimidine antitumor agent FdUMP[10] induces thymidineless death with topoisomerase I – DNA complexes. *Cancer Res* 65:4844-4851.
- Longley DB, Allen WL, McDermott U, Wilson TR, Latif T, Boyer J, Lynch M and Johnston PG (2004) The roles of Thymidylate synthase and p53 in regulation mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin Cancer Res* 10:3562-3571.
- Longley DB, Allen WL and Johnston PG (2006) Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochem Bioph Acta* 1766:184-196.
- Lönn U and Lönn S (1984) Interaction between 5-fluorouracil and DNA of human colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 44:3414-3418.
- Lorge E, Thybaud V, Aardema MJ, Oliver J, Wakata A, Lorenzon G and Marzin D (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat Res* 607:13-36.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74:957-967.
- Lu AL, Welsh K, Clark S, Su SS and Modrich P (1984) Repair of DNA base-pair mismatches in extracts of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 49:589-596.
- Luo Y, Walla M and Wyatt MD (2008) Uracil incorporation into genomic DNA does not predict toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase. *DNA Repair* 7:162-169.
- Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S and Fröhlich KU (2002) Apoptosis in yeast: a new modern system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 41:208-216.
- Mager WH and Winderickx J (2005) Yeast as a model of medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* 26:265-273.
- Maier P and Schmid W (1976) Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 40:325-338.
- Major PP, Egan E, Herrick D and Kufe DW (1982) 5-fluorouracil incorporation in DNA of human breast cancer cells. *Cancer Res* 42:3005-3009.
- Massey A, Offman J, Macpherson P and Karran P (2003) DNA mismatch repair and acquired resistance in *E. coli* and human ovarian carcinoma cells. *DNA Repair* 2:73-89.

- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I and Kirsch-Volders (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88:1515-1531.
- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate Jr M, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K and Sofuni T (1999) Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14:569-580.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF and Heddle JA (1990) The *in vivo* micronucleus test assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene Tox Program. *Mutat Res* 239:29-80.
- McKinnon PJ and Caldecott KW (2007) DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8:37-55.
- Meadows KL, Song B and Doetsch PW (2003) Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Res* 31:5560-5567.
- Mellon I (2005) Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat Res* 577:155-161.
- Memisoglu A and Samson L (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451:39-51.
- Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD and Boothman DA (2003) A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene* 22:7376-7388.
- Meyers M, Wagner MW, Mazurek A, Schmutte C, Fishel R and Boothman DA (2005) DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem* 280:5516-5526.
- Modrich P (1991) Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 25:229-253.
- Modrich P (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 281:30305-30309.
- Modrich P and Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65:101-133.
- Moller P (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:336-345.

- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T and Muto T (1998) 5-fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 78:986-992.
- Noordhuis P, Holwerda U, van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM and Peters GJ (2004) 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals Oncol* 15:1025-1032.
- O'Brien V and Brown R (2006) Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR system. *Carcinogenesis* 27:682-692.
- Ohuchida A, Hara T, Furukawa A, Sato S, Katoh M, Ishihara N and Shibuya T (1991) Mutagenicity of 5-fluorouracil and its metabolites. *Mutat Res* 253:269-270.
- Ohuchida A, Furukawa A, Yoshida J, Watanabe M, Aruga F, Miwa Y, Shinkawa K and Kinae N (1992) Micronucleus assay on 5-fluorouracil and 6-mercaptopurine with mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat Res* 278:139-143.
- Olive PL (1998) The role of DNA single and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 150:S42-S51.
- Oliver J, Meunier JR, Awogi T, Elhajouji A, Ouldelhkin MC, Bichet N, Thybaud V, Lorenzon G, Marzin D and Lorge E (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test V. Using L5178Y cells. *Mutat Res* 607:125-152.
- Parker BO and Marinus MG (1992) Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1730-1734.
- Pastinik A and Lohman PHM (1999) Repair and consequences of double-strand breaks in DNA. *Mutat Res* 428:141-156.
- Pastink A, Eeken JCJ, Lohman PHM (2001) Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat Res* 480:37-50.
- Pastwa E and Blasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Polonica* 50:891-908.
- Peller S (1998) Clinical implications of p53: effect on prognosis, tumor progression and chemotherapy response. *Semin Cancer Biol* 8:379-387.
- Peters GJ, Laurensse E, Leyva A (1986) Sensitivity of human, murine and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 46:20-28.

- Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM and Ackland SP (2000a) Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther* 87:227-253.
- Peters GJ and van Groeningen CJ (1991) Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Ann Oncol* 2:469-480.
- Peters GJ, van Triest B, Backus HHJ, Kuiper CM, van der Wilt CL and Pinedo HM (2000b) Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 36:916-924.
- Peters GJ, Backus HHJ, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL, Bloemena E, Meijer S, Jansen G, van Groeningen CJ and Pinedo HM (2002) Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1587:194-205.
- Pitcher RS, Brissett NC and Doherty AJ (2007) Nonhomologous end joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol* 61:259-282.
- Pitcher RS, Wilson TE and Doherty AJ (2005) New insights into NHEJ repair process in prokaryotes. *Cell Cycle* 4:675-678.
- Pizzorno G, Sun Z and Handschumacher RE (1995) Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 49:553-557.
- Plosky B, Samson L, Engelward BP, Gold B, Schlaen B, Millas T, Magnotti M, Schor J and Scicchitano DA (2002) Base excision repair and nucleotide excision repair contribute to the removal of N-methylpurines from active genes. *DNA Repair* 1:683-696.
- Plotz G, Zeuzem S and Raedle J (2006) DNA mismatch repair and Lynch syndrome. *J Mol Hist* 37:271-283.
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin. *Mutat Res* 355:71-89.
- Prakash S and Prakash L (2000) Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* 451:13-24.
- Rabello-Gay MN, Rodrigues MAR and Monteleone-Neto R (1991) Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Rev Bras Gen. pp.107-112.
- Rahman Z, Kohli K, Khar RK, Ali M, Charoo NA and Shamsheer AAA (2006) Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS PharmSciTech* 7:E47.

- Rang HP, Dale MM and Ritter JM (1997) *Farmacologia*. 3rd edition. Guanabara Koogan.
- Rass U, Ahel I and West SC (2007) Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell* 130:991-1004.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF and Marques EK (2003) *Mutagênese ambiental*. Ed. Ulbra 345p.
- Rosa RM, Sulzbacher K, Picada JN, Roesler R, Saffi J, Brendel M and Henriques JAP (2004) Genotoxicity of diphenil diselenide in bacteria and yeast. *Mutat Res* 563:107-115.
- Saffi J and Henriques JAP (2003) Reparação de DNA em células eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. 424p.
- Sancar A (1996) DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 65:43-81.
- Sarasin A and Strydom A (2007) New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA Repair* 6:265-269.
- Sawyer RC, Stolfi RL, Martin DS and Spiegelman S (1984) Incorporation of 5-fluorouracil into murine bone marrow DNA *in vivo*. *Cancer Res* 44:1847-1851.
- Schofield MJ and Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 57:579-608.
- Schuetz JD, Wallac HJ and Diasio RB (1984) 5-fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cell as a possible mechanism of toxicity. *Cancer Res* 44:1358-1363.
- Schuman S and Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature* 5:852-861.
- Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M and Stivers JT (2006) Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acid Res* 34:140-151.
- Shuck SC, Short EA and Turchi JJ (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18:64-72.
- Sierakowska H, Shukla RR, Dominski Z and Kole R (1989) Inhibition of pre-mRNA splicing by 5-fluoro, 5-chloro and 5-bromouridine. *J Biol Chem* 264:19185-19191.
- Simon JA, Szankasi P, Nguyen DK, Ludlow C, Dunstan HM, Roberts CJ, Jensen EL, Hartwell LH and Friend SH (2000) Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 60:328-333.

- Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, Gramont A, Bonatto D, Henriques JAP and Larsen AK (2007) Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13062-13067.
- Soares DG, Poletto NP, Bonatto D, Salvador M, Schwartzmann G and Henriques JAP (2005) Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol* 70:59-69.
- Sofuni T, Honma M, Hayashi M, Shimada H, Tanaka N, Wakuri S, Awogi T, Yamamoto KI, Nishi Y and Nakadate M (1996) Detection of *in vitro* clastogens and spindle poisons by the mouse lymphoma assay using the microwell method: interim report of an international collaborative study. *Mutagenesis* 11:349-355.
- Speit G and Hartmann A (1999) The comet assay (single cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Method Mol Biol* 113:203-212.
- Su SS, Lahue RS, Au KG and Modrich P (1986) *Escherichia coli* MutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5057-5061.
- Sung JS and Dемple B (2006) Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J* 273:1620-1629.
- Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW and Jinks-Robertson (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:2929-2935.
- Sweder and Hanawalt (1992) Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10696-10700.
- Thompson LH and Schild D (2001) Homologous recombination repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 477:131-153.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
- Tinkelenberg BA, Hansbury MJ and Ladner RD (2002) dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 62:4909-4915.
- Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM and Smith MT (1997) Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using

- the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. *Mutat Res* 338:85-95.
- Toissaint M, Levasseur G, Gevais-Bird J, Wellinger RJ, Elela SA and Conconi A (2006) A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutat Res* 606:92-105.
- Tokunaga E, Oda S, Fukushima M, Maehara Y and Sugimachi K (2000) Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 36:1998-2006.
- Torres-Bugarín O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, Gutiérrez-Franco A and Zuñiga-González G (2004) Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res* 565:91-101.
- Umar A and Kunkel TA (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* 238:297-307.
- van der Bosch M, Lohman PHM, Pastink A (2002) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 383:873-892.
- van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA and Mullenders LHF (2003) Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicol* 193:79-90.
- Vance JR and Wilson TE (2001) Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Mol Cell Biol* 21:7191-7198.
- Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, Lacorte JM, Staedal C and Lesuffleur T (2002) Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of bcl-2 and bcl-xl in addition to bax and p53 status. *Int J Cancer* 98:498-504.
- Walker G (1995) SOS-regulated proteins in translesional DNA synthesis and mutagenesis. *Trends Biochem Sci* 20:416-420.
- Wallace SS (1998) Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 150:S60-S79.
- Weller M (1998) Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell tissue Res* 292:435-445.
- Welsh KM, Lu AL, Clark S and Modrich P (1987) Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *J Biol Chem* 262:15624-15629.

- Werner JM and Steinfeldt HJ (2007) A microscope technique to study kinetics and concentration – response of drug induced caspase 3 activation on a single cell level. *J Pharmacol Toxicol Method* *in press*.
- Weterings E and Chen DJ (2007) DNA-dependent protein kinase in non-homologous end joining: a lock with multiple keys? *J Cell Biol* 179:183-186.
- Williamson MS, Game JC and Fogel S (1985) Meiotic gene conversion mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of *pms1-1* and *pms1-2*. *Genetics* 110:609-646.
- Wilson III DM and Bohr VA (2007) The mechanisms of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair* 6:544-559.
- Wojewódzka M, Grądzka I and Buraczewska I (2002) Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 47:1-5.
- Wood RD (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 65:135-167.
- Wood RD (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272:23465-23468.
- Yang W (2000) Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res* 460:245-256.
- Yin MB and Rustum YM (1991) Comparative DNA strand breakage induced by Fura and FdUrd in human ileocecal adenocarcinoma (HCT-8) cells: relevance to cell growth inhibition. *Cancer Commun* 3:45-51.
- Zhu F and Zhang (2003) DNA polymerase zeta: new insight into eukaryotic mutagenesis and mammalian embryonic development. *World J Gastroenterol* 9:1165-1169.
- Zúñiga-González GM, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez AL, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Gallegos-Arreola P, Flores-García A and Lopez-Urbe (2003) Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-fluorouracil. *Archives Med Res* 34:141-144.