

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA E APOPTOSE PELO TRATAMENTO  
COM ANTRACICLINAS EM FIBROBLASTOS HUMANOS DEFICIENTES NO REPARO  
POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS**

**LARISSA MILANO DE SOUZA**

**PORTO ALEGRE, 2011.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA E APOPTOSE PELO TRATAMENTO  
COM ANTRACICLINAS EM FIBROBLASTOS HUMANOS DEFICIENTES NO REPARO  
POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
em Biomedicina apresentado à Comissão  
de Graduação de Biomedicina como um  
dos requisitos para obtenção do Grau de  
Biomédico.

Larissa Milano de Souza

Orientador: Dr. Guido Lenz

Co-orientadora: Dra. Jenifer Saffi

**PORTO ALEGRE, 2011.**

## **APRESENTAÇÃO**

Esse trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Reparação de Eucariontes e do Laboratório de Sinalização Celular, sob orientação do Prof. Dr. Guido Lenz, e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Jenifer Saffi, com a finalidade da realização desse Trabalho de Conclusão de Curso, não fazendo parte de nenhum projeto de mestrado ou doutorado.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO .....	8
I. INTRODUÇÃO .....	9
1. Introdução Geral .....	9
2. Doxorubicina e Daunorrubicina .....	11
3. Reparo por excisão de nucleotídeos .....	12
4. Apoptose.....	16
5. Senescência .....	18
II. TRABALHO EXPERIMENTAL/ ARTIGO CIENTÍFICO .....	21
1. Introdução .....	23
2. Materiais e métodos .....	25
3. Resultados .....	27
4. Discussão .....	35
Referências .....	39
III. CONCLUSÕES .....	43
IV. PERSPECTIVAS .....	44
V. REFERÊNCIAS .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF – Fator Indutor de Apoptose  
ATP – Trifosfato de Adenosina  
CDKIs – Cinases Dependentes de Ciclinas  
CPD – Ciclobutano Pirimidina  
CS – Síndrome de Cockayne  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DNR – Daunorrubicina  
DOX – Doxorrubicina  
ENDO Endonuclease G  
GGR – Reparo do Genoma Global (*Global Genome Repair*)  
NER – Reparo por Excisão de Nucleotídeos  
PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular  
PDT – Ensaio de *population doubling time*  
RFC – Fator de Replicação C  
RNA – Ácido Ribonucleio  
SA- $\beta$ -gal – $\beta$ -galactosidase associada à Senescência  
TCR – Reparo Acoplado à Transcrição (*Transcription Coupled Repair*)  
TFIIH – Fator de Transcrição IIH  
Topo II – Topoisomerase II  
TTD – Tricotriodistrofia  
UV – Luz Ultravioleta  
XP – *Xeroderma pigmentosum*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Danos ao DNA, vias de reparo e respostas celulares.....	9
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da Doxorubicina e da Daunorrubicina.....	10
<b>Figura 3.</b> Reparo por excisão de nucleotídeos.....	12
<b>Figura 4.</b> Pacientes com XP, TTD e CS.....	14
<b>Figura 5.</b> Os vários caminhos da senescência.....	18

## RESUMO

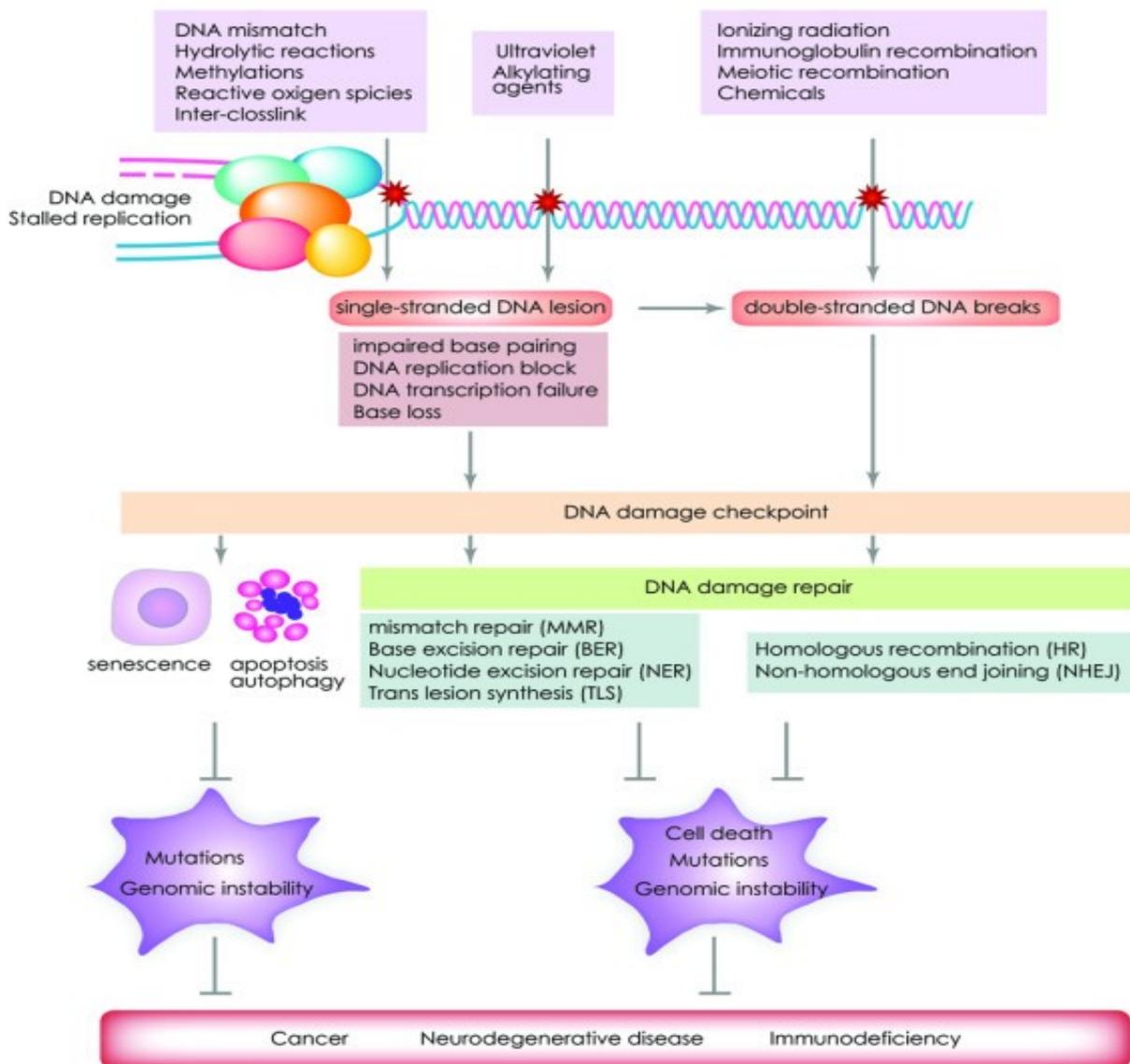
Dentre os agentes antitumorais, as antraciclina Doxorubicina (DOX) e Daunorrubicina (DNR) estão entre as drogas mais utilizadas. Seu mecanismo de ação classicamente reconhecido é a inibição da enzima topoisomerase II. No entanto estes agentes são responsáveis ainda pela geração de radicais livres, formação de pontes inter e intracadeia e de adutos no DNA. Pouco se sabe sobre como essas lesões são reparadas, mas existem indícios do envolvimento do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) na remoção dessas lesões. O NER é uma das vias mais versáteis de reparo envolvido principalmente em lesões que levam a desestabilidade na dupla hélice do DNA. Neste trabalho linhagens celulares de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes no NER (CSB, XPA e XPD) foram submetidas ao tratamento com DOX e DNR e avaliadas para viabilidade celular, morfologia nuclear, apoptose e senescência. Os resultados aqui obtidos demonstram que as linhagens deficientes no NER são mais sensíveis aos agentes do que a respectiva linhagem proficiente, e que morrem principalmente por apoptose. Quando avaliada a senescência celular, percebeu-se que as linhagens MRC5 e XPA entram em senescência com os tratamentos utilizados enquanto que nas linhagens CSB e XPD não se observa a mesma resposta. Provavelmente o resultado encontrado decorre do fato de CSB e XPD exercerem papel na transcrição e morrerem por apoptose antes de entrar em senescência, ou ainda pela importância delas na indução de senescência. Além disso, observou-se independência do mecanismo de inibição da topoisomerase II na citotoxicidade causada por DOX e DNR. Somando-se os dados encontrados, podemos sugerir que o NER tem envolvimento no reparo das lesões causadas por DOX e DNR, e que essa via possivelmente está associada à resistência encontrada na terapia clínica do câncer com essas drogas.

# I. INTRODUÇÃO

## 1.Introdução Geral

Continuamente nossas células são expostas a uma série de insultos exógenos e endógenos. Muitos dos agentes nocivos acabam danificando a molécula de DNA, que é indispensável para a célula em decorrência do seu conteúdo biológico informacional, que posteriormente é o responsável por determinar as respostas ao meio [1,2].

Dada a complexidade dos organismos, é esperado que evolutivamente tenham sido desenvolvidos uma série de mecanismos que nos permitam conviver com esses insultos e prosseguir com a vida no ambiente [3]. Tais mecanismos de checagem (*checkpoints*) promovem uma parada no ciclo celular e permitem o reparo de DNA, a senescência, ou determinam vias de morte celular. Na falha destes, as células acabam acumulando mutações que podem levar, por exemplo, a uma série de doenças hereditárias ou a um processo tumoral (Figura 1). O reparo de DNA é uma soma de vias que reparam de acordo com o tipo de lesão, envolvendo mecanismos complexos com diversas proteínas de diferentes funções, que às vezes se sobrepõem com outras funções celulares [4].

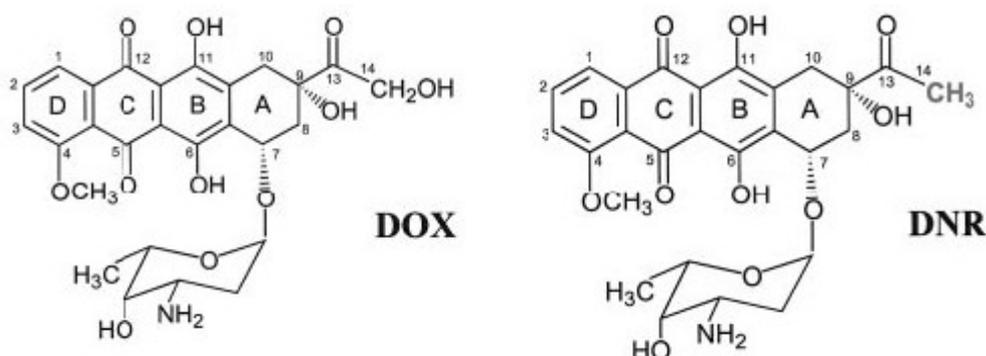


**Figura 1. Danos ao DNA, vias de reparo e respostas celulares [5].** Uma série de agentes levam a danos ao DNA que após serem detectados desencadeiam diversas respostas. Quando essas respostas são bloqueadas, podem causar morte celular, mutações e instabilidade genômica que tem como desfecho uma série de patologias.

## 2. Doxorrubicina e Daunorrubicina

Doxorrubicina (DOX) e Daunorrubicina (DNR) estão entre as primeiras antraciclina isoladas na década de 60, a partir de *Streptomyces peucetius*. São antibióticos antitumorais constituídos de uma porção aglicônica (Figura 2), formada por um anel tetracíclico com grupamentos quinona e hidroquinona adjacentes e uma porção glicosídica nomeada de daunosamina. Apesar destas moléculas diferirem apenas em seus ligantes laterais (enquanto DOX possui um álcool primário, DNR termina com uma metila), elas exibem um espectro de ação diferente. DOX é utilizada principalmente em câncer de mama, tumores sólidos da infância, sarcomas de tecidos moles e linfomas agressivos, enquanto DNR tem sido usada em leucemias linfoblásticas e mieloblásticas agudas [6].

No entanto, apesar do extenso uso clínico, o mecanismo de ação dessas drogas ainda não é completamente compreendido. O mecanismo mais bem caracterizado é a inibição da enzima topoisomerase-II (topo II) formando um complexo ternário antraciclina-topo II-DNA, gerando quebras duplas no DNA. Isto pode levar a uma parada no ciclo celular, o que permite à célula recrutar as enzimas de reparo, entrar em senescência ou ainda levar à morte por apoptose. Além disso, outros mecanismos estão envolvidos na indução de citotoxicidade das antraciclina, como a formação de radicais livres ou através da atuação direta sobre a estrutura do DNA, causando alquilações, pontes intercadeia e adutos [7,8].



**Figura 2. Estrutura química da Doxorrubicina e da Daunorrubicina.** Constituição básica das antraciclina que possuem quatro anéis aromáticos (A, B, C e D) assim como um açúcar ligado a posição 7 do anel A [6].

### 3. Reparo por excisão de nucleotídeos

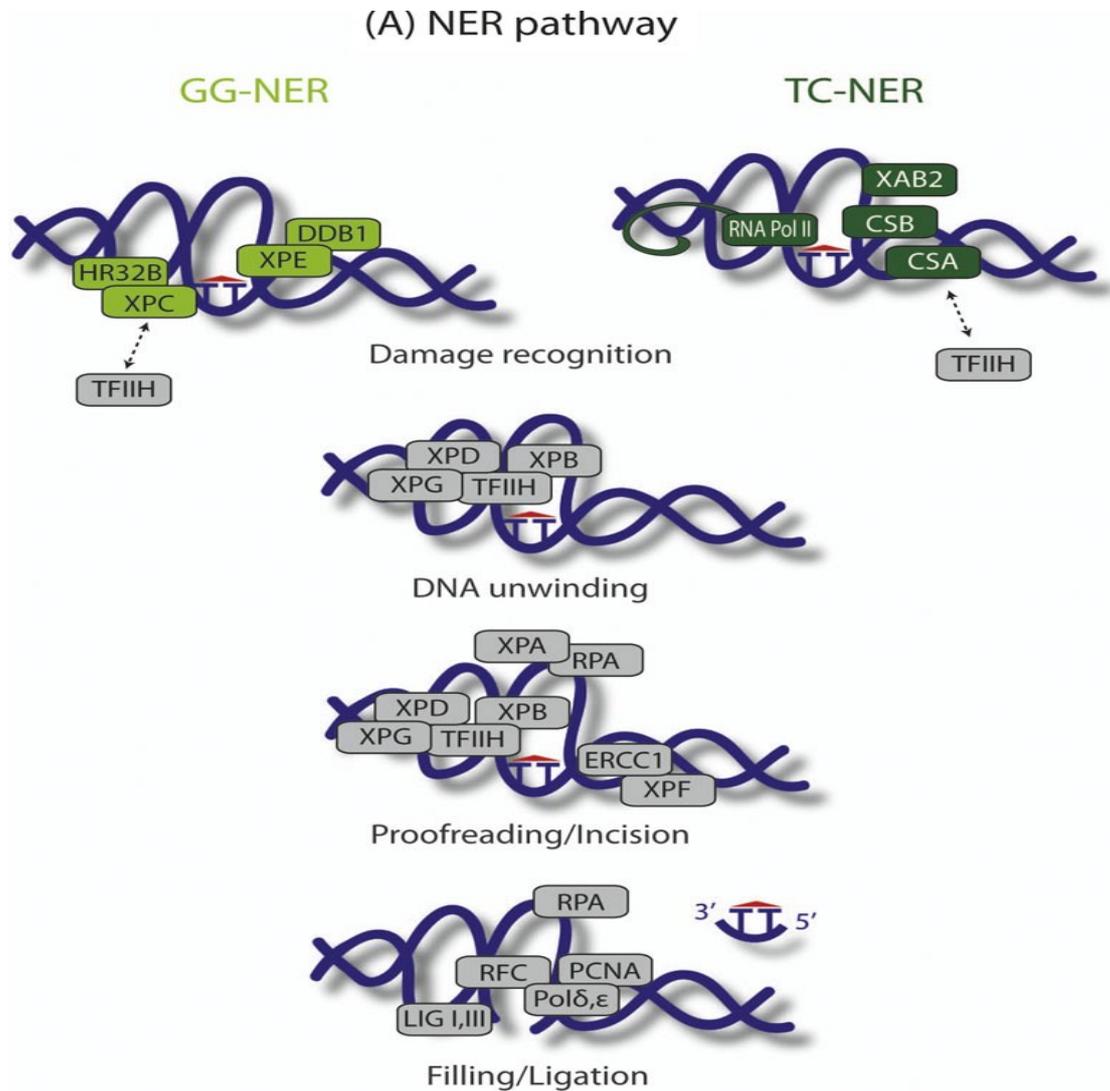
Alterações no DNA podem comprometer a replicação e a transcrição, levando a instabilidade genômica, mutagênese, senescência ou morte celular. Assim, a remoção dessas lesões é um processo de vital importância para a manutenção celular em estado funcional. Para tanto, uma cascata de eventos deve ocorrer de forma adequada, desde o reconhecimento do dano no DNA, a suspensão do ciclo celular e a ativação de mecanismos de reparo de DNA específicos [9].

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma das vias mais versáteis e flexíveis de reparo, responsável pelo reparo de uma gama de lesões estruturais não relacionadas entre si. Adutos volumosos no DNA, como fotolesões (6-4 fotoprodutos) e dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), causados por luz ultravioleta, pontes intra e intercadeias (*crosslinks*), entre outras, são reparadas pelo NER [10]. Esse sistema age removendo lesões que levam a distorções da dupla hélice, interferem no pareamento de bases e bloqueiam a replicação do DNA. O processo é realizado através de uma estratégia astuta: em vez de possuir uma coleção de enzimas específicas para reconhecer lesões diferentes, o NER as detecta através das distorções que causam no DNA.

Os mecanismos básicos desta via de reparo são conservados evolutivamente, onde processos análogos no reconhecimento da lesão, na incisão do DNA, excisão do fragmento e na ressíntese da fita de DNA são observados entre bactérias, leveduras e mamíferos [11, 12].

Diversos estudos bioquímicos e moleculares têm demonstrado que o sistema NER (Figura 3) pode ser dividido em duas sub-vias de reparação: a reparação global do genoma (GGR), que pode detectar e remover lesões através do genoma e a reparação acoplada a transcrição (TCR), que garante um reparo mais rápido de lesões localizadas na fita transcrita de genes que estão sendo expressos [13,14]. O GGR é iniciado pelo complexo protéico XPC/hHR23B, que medeia o reconhecimento da distorção da hélice de DNA, enquanto no caso do TCR isso acontece pelo bloqueio da RNA polimerase II na lesão da fita que está sendo transcrita e pelo recrutamento dos fatores CS (CSA e CSB), que embora essenciais para este tipo de reparo ainda tem papel parcialmente definido[15]. Sabe-se que CSB é uma proteína da família SWI/SNF de remodeladores de cromatina dependentes de ATP, havendo indícios de que CSB possui papel também na transcrição [11]. Após, ocorre a convergência das duas sub-vias, onde é recrutado o fator de transcrição TFIIH, um complexo multiprotéico composto por 10 subunidades dentre as quais estão XPD e XPB, com atividades de helicase e ATPase, respectivamente, que fazem a abertura da hélice de DNA [16], gerando fitas simples ao redor da lesão, facilitando o recrutamento de XPA e RPA. Estas últimas possuem papel de verificar a lesão, proteger o DNA fita simples e estabilizar o complexo pré-incisional [17]. O complexo endonucleásico ERCC1-XPF é então recrutado e incide

a fita danificada na porção 5', enquanto XPG incide em 3'. O oligonucleotídeo que possui a lesão é então removido, e a lacuna resultante é preenchida pelas polimerases  $\delta$  e  $\epsilon$ , provavelmente associadas ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e ao fator de replicação C (RFC). Sendo posteriormente a fita ligada pela DNA ligase III, com uma menor contribuição da DNA ligase I em células replicativas [18].



**Figura 3. Reparo por excisão de nucleotídeos.** Apesar do processo de reconhecimento de danos no DNA ocorrer de forma distinta as duas vias do NER, GGR e TCR convergem para uma via única [19].

Insuficiências no NER são conhecidas por causar doenças hereditárias (Figura 4) como *Xeroderma pigmentosum* (XP), Síndrome de Cockayne (CS) e Tricotiodistrofia (TTD) [18]. *Xeroderma pigmentosum* é uma síndrome autossômica recessiva na qual o paciente apresenta uma

severa sensibilidade à luz solar, o que desencadeia uma progressiva degeneração das regiões da pele e dos olhos expostas ao sol, levando a várias formas de malignidade, tendo alta incidência de câncer de pele. Um número significativo desses pacientes também apresenta uma degeneração neurológica progressiva [20,21]. CS é caracterizada por fotosensibilidade cutânea e aumentada sensibilidade à luz UV devido a uma deficiência na via de reparo acoplada à transcrição (TCR). Esses pacientes apresentam disfunções no desenvolvimento físico e neurológico [15,20]. Algumas mutações em genes XP (XPB, XPD e XPG) levam ao tipo severo e raro de CS, onde os acometidos manifestam uma combinação de sintomas de XP com CS (XP/CS) [15, 18, 21]. As degenerações neurológicas presentes tanto em CS, como em alguns pacientes XP, tem sido correlacionadas com uma atividade precária do NER em reparar lesões oxidativas no DNA durante o desenvolvimento inicial do cérebro [15].

A TTD tem como principal característica a redução da matriz protéica rica em cisteínas dos cabelos (*sulfur-deficient brittle hair*), além da redução de estatura, comprometimento mental e ictiose (pele escamosa). A maioria dos pacientes apresenta sensibilidade à luz solar, devido à deficiência do NER atribuída às mutações em subunidades do TFIIH, embora não haja referência de câncer nesses pacientes nem de anormalidades de pigmentação da pele [15,20,22,23].

A diferença de sintomas entre os pacientes XP e os pacientes CS e TTD pode estar ligada com defeitos relacionados à transcrição encontrados em CS e TTD, já que essas síndromes são causadas por mutações em subunidades de TFIIH ou em proteínas que interajam com este complexo, como CSA e CSB [14]. Acredita-se que a alta incidência de câncer em pacientes XP esteja correlacionada com deficiências no GGR [1]. Pacientes com TTD e deficiências em TCR ou CS não apresentam suscetibilidade aumentada ao câncer [1].



**Figura 4. Pacientes com XP (a), TTD (b) e CS (c).** É notável a diferença de pigmentação dos pacientes CS e TTD comparados aos pacientes XP. Adaptado de Lehmann (2001) [22].

#### 4. Apoptose

A fim de eliminar células alteradas ou desnecessárias, organismos vivos possuem um mecanismo de “*suícido celular*” denominado de apoptose. Apoptose é a morte celular programada que exerce um papel vital para o desenvolvimento normal e manutenção da estrutura dos órgãos e tecidos, para a manutenção da homeostasia celular e na resposta imune efetiva. Este processo serve como parte de um controle de qualidade que contribui para o alto nível de plasticidade durante o desenvolvimento, compensando muitos erros genéticos ou estocásticos. Além disso, a apoptose participa na eliminação de células após indução de dano por agentes genotóxicos [24].

Morfologicamente a apoptose é caracterizada por: arredondamento da célula, retração de pseudópodes, redução do volume celular (“*pyknosis*”), condensação da cromatina, fragmentação nuclear (“*Karyorrhexis*”), pouca ou nenhuma alteração estrutural em organelas citoplasmáticas, formação de prolongamentos de membrana plasmática (“*blebbing*”) com a manutenção da integridade desta até o final do processo, e *in vivo* pelo engolfamento por fagócitos [25].

As alterações observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. As caspases, pertencentes à família de cisteínas proteases, sinalizam e executam a apoptose clivando substratos que possuem resíduos de aspartato em seqüências específicas. Duas principais vias de ativação de caspases foram descritas e reconhecidas: a via extrínseca, envolvendo os chamados receptores de morte localizados na superfície da célula, e a via intrínseca, provocada por várias formas de estresse, incluindo suporte inadequado de citocinas, diversos tipos de danos no DNA e hipóxia. Apesar da heterogeneidade de sinais que desencadeiam essa via, ela está associada a um mecanismo de controle central da mitocôndria [26].

O papel da mitocôndria nessas vias apoptóticas pode envolver a permeabilização da sua membrana e consequente liberação do citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas nela presentes. As duas vias de apoptose possuem grupos de caspases “iniciadoras” independentes, compartilhando as caspases “efetoras” que executam o final do programa de morte celular [27]. Enquanto a via de apoptose extrínseca é dependente da ativação de caspases, a apoptose intrínseca pode ocorrer de forma independente por mecanismos ativos através do fator de indução de apoptose (AIF) e da endonuclease G (ENDO), que migram da mitocôndria para o núcleo após estímulos de apoptose e induzem a condensação de cromatina e fragmentação do DNA, ou ainda por mecanismos passivos como o esgotamento de ATP [26]. Além disso, a apoptose é regulada por uma série de fatores pró-apoptóticos, muitos dos quais são genes supressores tumorais inativos em vários

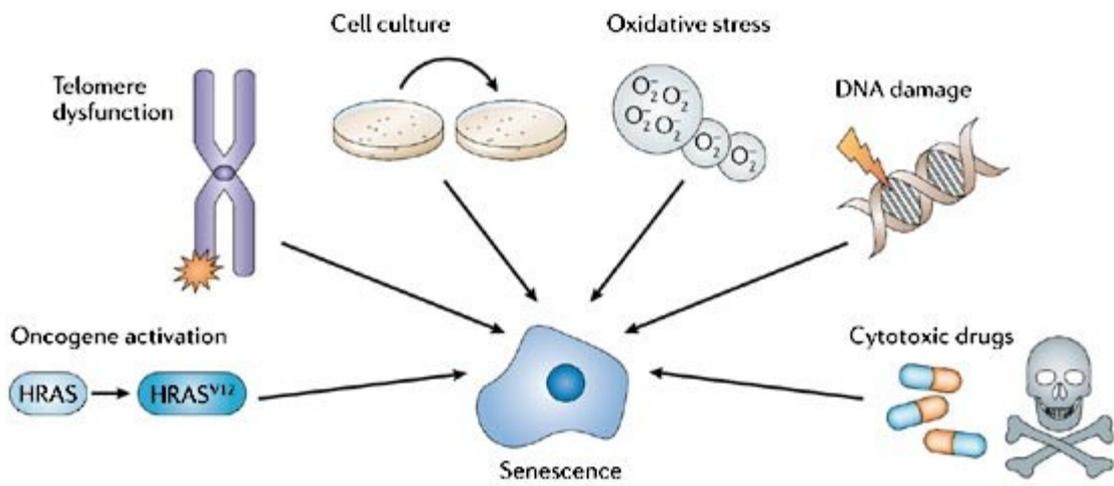
tipos de cânceres como Bax, Bid, Bak e Bad, e antiapoptóticas, proto-oncogenes normalmente superexpressos em cânceres como Bcl-2 e Bcl-XL. As proteínas inibidoras de apoptose (IAP) atuam inibindo a atividade de algumas caspases e modulando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Por outro lado, a proteína p53 participa como supressor tumoral, tendo fundamental importância na manutenção do genoma, permitindo a ação de mecanismos de reparo de DNA ou removendo células danificadas através da apoptose.

## 5. Senescência

A senescência é um mecanismo que limita o tempo de vida celular e constitui uma barreira para a imortalização celular, onde a célula perde irreversivelmente a capacidade de proliferação [29]. Células senescentes caracterizam-se morfologicamente por serem mais largas e planas que as demais em cultura, pela presença de vacúolos que coram positivamente para o marcador  $\beta$ -galactosidase associada à senescência. Além disso, vias efetoras importantes estão envolvidas, como p53 e RB. [30].

A senescência replicativa resulta da redução dos telômeros e pelo aumento da expressão de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKIs), podendo ser revertida pela expressão da subunidade catalítica da telomerase. Mesmo que a perda de telômeros não seja detectada, células podem entrar em senescência por vias que não envolvem a divisão celular contínua induzida por uma variedade de condições como agentes que danificam o DNA e ativação oncogênica, e dessa forma é nomeada de prematura ou induzida por estresse. Células normais respondem a muitos oncogenes, como por exemplo RAS, entrando em senescência. A senescência induzida por oncogenes (OIS), que parece ser um mecanismo antitumoral endógeno importante, envolve a ativação de p53, expressão de p21 e p16, além da formação de heterocromatina através da metilação de histonas. Uma distinta forma de senescência é caracterizada pela perda de PTEN, impedindo a hiperreplicação [31].

A quimioterapia clássica tem como foco principal a eliminação das células tumorais, levando as células à morte. No entanto a senescência tem um papel importante em impedir o desenvolvimento tumoral, já que as células perdem a capacidade de proliferar. É relatado na literatura que o tratamento em baixas concentrações com DOX em linhagens celulares de neuroblastoma estão correlacionadas com a parada de crescimento celular e alterações na proliferação celular com perfil semelhante à senescência. Além disso também já relatou-se DNR induzindo perfil semelhante a senescência em células Jurkat T [32, 33].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
**Nature Reviews | Cancer**

**Figura 5. Os vários caminhos da senescência.** Diversos fatores podem levar à parada irreversível da proliferação, conhecida como senescência [34].

## **II. TRABALHO EXPERIMENTAL/ ARTIGO CIENTÍFICO**

-De acordo com as normas do periódico:

*“DNA Repair “ ( <http://www.journals.elsevier.com/dna-repair/> )*

Apesar de o trabalho ter sido escrito nas normas do periódico *DNA Repair*, as legendas e figuras deste trabalho foram inseridas no corpo de texto para se mais didático.

## II. TRABALHO EXPERIMENTAL/ ARTIGO CIENTÍFICO

*Importância das proteínas XPA, CSB e XPD na citotoxicidade induzida pelas Antraciclinas  
Doxorrubicina e Daunorrubicina*

Larissa Milano de Souza<sup>a\*</sup>, Temenouga Nikolova Guecheva<sup>a</sup>, Jenifer Saffi<sup>a,b</sup>, Guido Lenz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor correspondente:

Larissa Milano de Souza

[milano.lari@gmail.com](mailto:milano.lari@gmail.com)

Laboratório de Reparação de DNA de Eucariontes, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43422-  
Lab. 210, Bairro Agronomia, CEP 915001970, Porto Alegre-RS  
Tel.: +55 51 33087602

## RESUMO

As antraciclina doxorubicina (DOX) e daunorrubicina (DNR) são importantes agentes na terapia do câncer. O mecanismo de ação destas drogas inclui inibição da topoisomerase II, geração de radicais livres, adutos de DNA e formação de pontes intercadeia. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) participa da remoção de lesões que distorcem a dupla hélice do DNA e de adutos químicos. A literatura relata que linhagens celulares deficientes no NER são mais sensíveis ao tratamento com antraciclina, no entanto pouco se sabe sobre os processos celulares que ajudam a célula a sobreviver após o tratamento com essas drogas. Neste trabalho verificou-se a sensibilidade e o tipo de mecanismo celular decorrente do tratamento com DOX e DNR em linhagens de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos (CSB, XPA e XPD). Para tanto, foram realizados ensaios de MTT, Anexina-V,  $\beta$ -galactosidase associada à senescência e análise da morfologia nuclear. Os resultados obtidos indicam que as linhagens deficientes no NER são mais sensíveis ao tratamento com antraciclina morrendo principalmente por apoptose. Observou-se também, que as linhagens MRC5 e XPA entram no processo de senescência celular após o tratamento, porém, as linhagens CSB e XPD não são induzidas a este mecanismo, provavelmente por também estarem associadas à transcrição. O tratamento com um inibidor catalítico de topoisomerase II demonstrou que a sensibilidade causada por DOX e DNR nas linhagens utilizadas não é dependente da inibição da topoisomerase II nas condições realizadas. Analisados conjuntamente esses resultados sugerem a participação do NER no reparo das lesões causadas pelas antraciclina utilizadas, e possivelmente um papel dessa via na resistência encontrada na terapia do câncer com antraciclina.

**Palavras-chave:** Doxorubicina, Daunorrubicina, Reparo por excisão de nucleotídeos, Senescência, Apoptose.

## 1. Introdução

As antraciclina são um dos grupos de quimioterápicos mais utilizados no tratamento clínico do câncer [1]. Doxorrubicina (DOX) e daunorrubicina (DNR) estão entre as primeiras antraciclina isoladas de *Streptomyces peucetius* no início dos anos 60. Elas diferem apenas na sua cadeia lateral, onde DOX termina com um álcool primário e DNR com uma metila. Essa mínima diferença tem importante consequência no espectro de atividade dessas drogas, enquanto DOX é um componente essencial no tratamento do câncer de mama, de tumores sólidos e de alguns linfomas agressivos, DNR apresenta atividade em leucemias agudas mieloblásticas e linfoblásticas.

O mecanismo de ação destas antraciclina ainda não é completamente compreendido, embora a inibição da enzima topoisomerase II (topoII) e subsequente formação de quebras duplas no DNA (DSBs) pareça ser o mecanismo predominante na citotoxicidade [2]. No entanto, vários outros mecanismos estão envolvidos na citotoxicidade das antraciclina [2,3], incluindo inibição da síntese de DNA e RNA, pontes intercadeias, produção de radicais livres e formação de adutos no DNA [4-8]. Estes mecanismos podem levar a uma parada no ciclo celular, tendo como consequência o recrutamento da maquinaria de reparo no DNA, de senescência e em última instância levando à morte celular. Além disso, como normalmente observado para os agentes quimioterápicos, as respostas celulares ao tratamento são afetadas não somente pela concentração da droga [7], como também pelo tipo celular específico [8].

Apesar do extenso uso na quimioterapia, pouco se sabe sobre os mecanismos de reparo de DNA envolvidos na remoção das lesões causadas por antraciclina. Portanto, é um desafio dissecar as vias envolvidas neste processo, que se bem sucedido pode favorecer o prognóstico dos pacientes em tratamento clínico com essas drogas.

Uma das vias que podem ser importantes para o reparo das lesões causadas por antraciclina é o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), uma das mais versáteis vias de reparo de DNA, que remove uma grande variedade de lesões que levam à desestabilidade da dupla hélice de DNA, incluindo as causadas por luz ultravioleta (UV) e adutos químicos gerados pela exposição à agentes genotóxicos [9]. Existem duas sub-vias no NER, o reparo global do genoma (GGR) e o reparo acoplado à transcrição (TCR), que diferem apenas na etapa envolvida no reconhecimento da lesão no DNA. No TCR o reconhecimento do dano, se dá pelo bloqueio da RNA polimerase II e recrutamento das proteínas CSA e CSB, onde CSB é membro de uma família de ATPases dependentes de DNA, relacionada ao remodelamento da cromatina e possivelmente envolvida no recrutamento do fator de transcrição TFIIH [10]. Seguindo o reconhecimento do dano, as helicases XPB e XPD associadas ao complexo TFIIH, abrem a dupla hélice. A seguir as endonucleases XPG

e ERCC1-XPF clivam a fita danificada. As proteínas XPA e RPA também são importantes para a eficácia do processo de reparo verificando a presença do dano e estabilizando a fita aberta, que é seguido pela remoção do segmento de DNA que contem a lesão, e ressíntese usando como modelo a fita intacta [11,12].

A importância biológica do NER, é ressaltada por severas consequências clínicas associadas a um defeito hereditário no NER como envelhecimento precoce, anormalidades no desenvolvimento e suscetibilidade ao câncer [12-15]. Defeitos na família de proteínas XP geralmente tem como desfecho clínico Xeroderma pigmentosum (XP) ou tricotriodistrofia (TTD), enquanto defeitos em CS são associados à síndrome de Cockayne [14-18].

O provável envolvimento de proteínas do NER como XPA, XPC [14,20] e XPD [19], no reparo de lesões causadas pela DOX levou-nos a investigar as respostas decorrentes do tratamento com as antraciclina DOX e DNR. Células deficientes em CSB, XPA e XPD e células proficientes no reparo por excisão de nucleotídeos foram tratadas com uma das drogas em estudo e analisadas para viabilidade celular, apoptose e senescência. Os resultados indicam que as linhagens deficientes no NER são mais sensíveis ao tratamento com essas drogas quando comparadas à linhagem proficiente no reparo, sugerindo um papel do NER no reparo dessas lesões.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Cultura de células

Os fibroblastos transformados por SV40 utilizados nesse trabalho proficientes no reparo de DNA (MRC5), ou deficientes no reparo de DNA isolados de biópsias de pele de pacientes com XP e CS: XP12RO (células XP-A), XP6BE (células XP-D) ASCN1 (células CS-B). A linhagem normal MRC5 foi utilizada como controle. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alain Sarasin ((Institut Gustave-Roussy, Villejuif, França). Todos os materiais de cultura foram obtidos da Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, 1% glutamina à 37°C/5% CO<sub>2</sub> em estufa umidificada.

### 2.2. Viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços na concentração de  $1.10^4$  células por poço em meio completo e crescidas por 24 h antes do tratamento. As culturas foram tratadas com diferentes concentrações de DOX ou DNR por 72 h. Depois de cada tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e o sal de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil)difenil tetrazólio] foi adicionado à cada poço em condições estéreis (concentração final de 5mg/ml). Posteriormente as placas foram incubadas por 4 h a 37°C [21]. Os cristais de Formazan foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (1 ml/poço). Os cristais roxos de Formazan são formados a partir do MTT amarelo pela succinato desidrogenase em células viáveis. A absorbância do produto formazan foi medida a 540 nm com o leitor de placas EnSpire Multimode Plate Readers (PerkinElmer Inc.). A viabilidade celular foi representada com relação ao percentual de viabilidade de células não tratadas, estimada em 100% do controle. Todos os valores são médias de três experimentos independentes, cada um em triplicata. Para o ensaio com o inibidor catalítico de topoisomerase II, Suramina (100  $\mu$ M), este foi adicionado 30 min antes dos tratamentos com DOX ou DNR e o ensaio seguiu-se como descrito anteriormente.

### 2.3. $\beta$ -galactosidase associada à Senescência (SA- $\beta$ -gal)

A coloração da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência nas células foi realizada conforme

descrito previamente por Dimri et al. [22]. As células foram tratadas por 72 h com DOX ou DNR e após 7 dias em meio sem tratameto, as células foram lavadas com PBS, fixadas durante 15 min em formaldeído 3% à temperatura ambiente, lavadas novamente, e incubadas com a solução de coloração de SA- $\beta$ -gal contendo 1 mg/mL 5-bromo-4cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactosídeo (X-gal, Sigma), 40 mM ácido cítrico/fosfato de sódio (pH 6.0), 5 mM ferrocianeto de potássio, 5 mM ferricianeto de potássio, 150 mM NaCl, and 2 mM MgCl por 12–16 h à 37°C. O percentual de células coradas foi determinado depois da contagem de três campos aleatórios com 100 células cada.

### *2.3. Citometria de fluxo com Anexina V*

A externalização da fosfatidilserina foi determinada pelo sinal fluorescente da Anexina V-FITC com o Kit ApoDETECT (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) conforme o protocolo do fabricante. Células na concentração de  $5 \cdot 10^4$  por poço foram plaqueadas em placa de 24 poços, em seguida foram tratadas por 72h com DOX ou DNR. Após, as células são tripsinizadas e incubadas com uma solução contendo iodeto de propídeo (IP) e Anexina por 30 min, como indicado pelo fabricante. As amostras foram analisadas com o citometro de fluxo Guava Flow Cytometer e o software GUAVA Cytosoft (Millipore, Billerica, MA).

### *2.4. Análise da Morfologia Nuclear (NMA)*

Para realizar a análise da morfologia nuclear as células foram plaqueadas e tratadas com DOX ou DNR, e após 72 fixadas durante 15 min com formaldeído 3% ou metanol, e coradas com 300nM de 4,6 -diamino 2-fenil-indol (DAPI). Após coloração, fotos foram obtidas com microscópio invertido de fluorescência Carl Zeiss e as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ e submetidas ao *plugin* NII de acordo com Filippi-Chiela et. al. [23], devido alguns erros na execução do software por ainda estar em fase experimental, os dados obtidos com essa análise serviram apenas para avaliar a senescência celular.

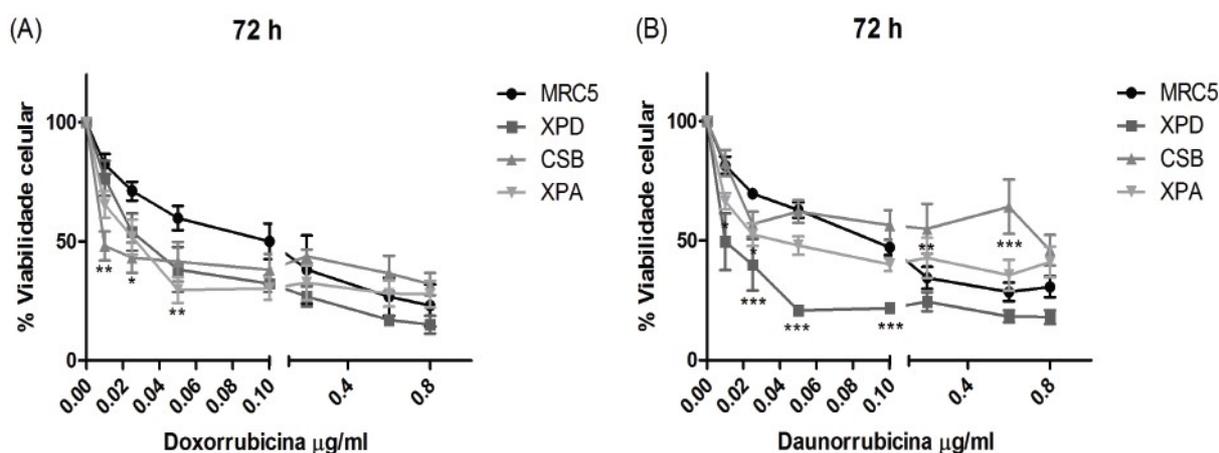
### *2.5. Análise estatística*

Os resultados são médias de três experimentos independentes com barras de erros demonstrando o erro padrão. Diferenças experimentais foram testadas para significância utilizando análise de variância ANOVA duas vias, seguida de pós teste Bonferroni (Prism 5 – GraphPad Software Inc., Califórnia, EUA).

### 3. Resultados

#### 3.1. Viabilidade celular

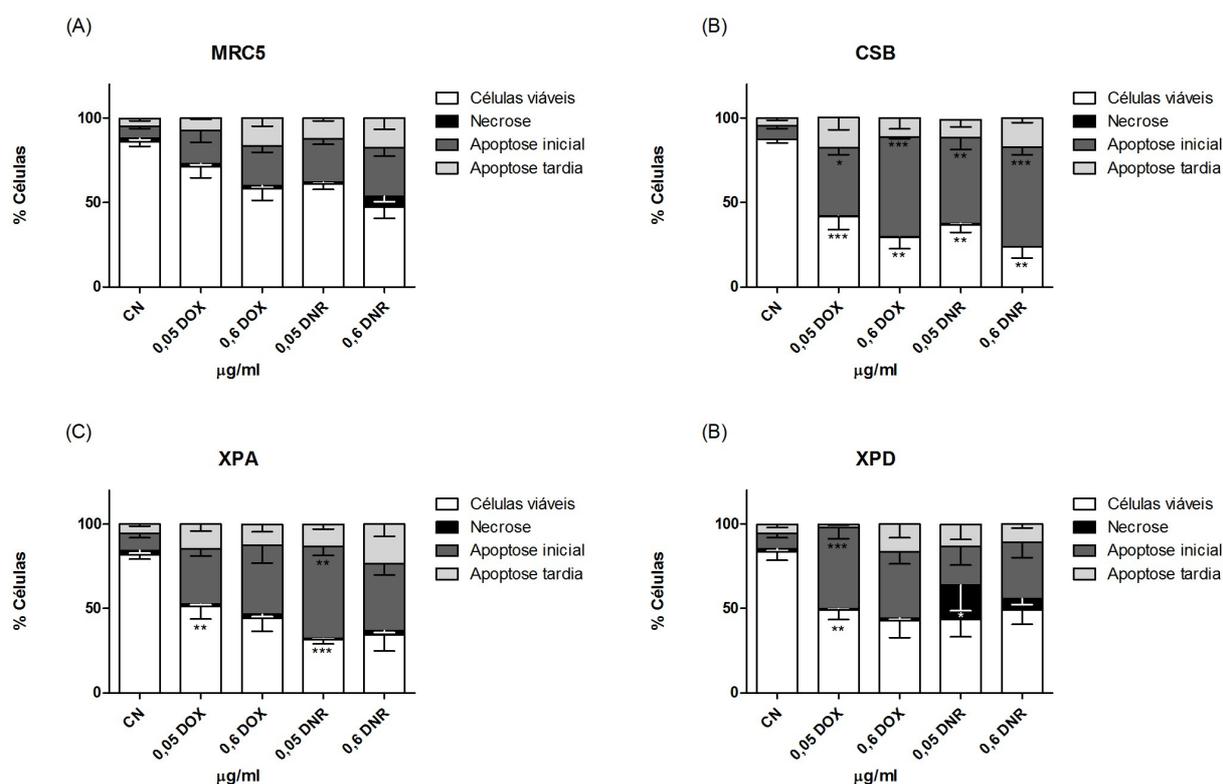
Com a finalidade de definir a citotoxicidade de DOX e DNR nas linhagens celulares proficientes (MRC5) e deficientes (CSB, XPA e XPD) no reparo de DNA, realizou-se uma curva de viabilidade através do ensaio de MTT. A Fig.1A demonstra que as linhagens deficientes em CSB, XPA e XPD, apresentam maior sensibilidade ao tratamento de 72h com DOX, quando comparadas com a linhagem proficiente em reparo MRC5 até a concentração de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Com relação ao tratamento de 72h com DNR (Fig. 1B), a linhagem celular deficiente em XPD demonstrou alta sensibilidade quando comparada a linhagem proficiente MRC5, enquanto as linhagens deficientes em CSB e XPA apresentaram sensibilidade intermediária.



**Fig. 1.** Sensibilidade das linhagens deficientes em CSB, XPA e XPD e da linhagem MRC5 às antraciclinas. 1.  $10^4$  células são expostas durante 72 h à DOX (A) e DNR (B) e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Resultados são expressos como porcentagem do crescimento do controle para cada ponto e representa a média ( $\pm$  erro padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística foi aplicada comparando-se a linhagem proficiente MRC5 com as linhagens deficientes em NER, CSB, XPA e XPD. Significativamente diferente em relação ao controle \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

### 3.2. Indução de apoptose por DOX e DNR

Apoptose foi quantificada após 72h de tratamento com 0,05µg/ml e 0,6 µg/ml de DOX e DNR através da marcação com Anexina V-FITC/IP e analisada por citometria de fluxo. A Anexina V ligada aos resíduos de fosfatidilserina externalizados na membrana celular é um marcador inicial de apoptose, enquanto iodeto de propídeo (IP) é um corante de DNA impermeável à membrana. Como demonstrado na Fig. 2, após o tratamento de 72h com DNR e DOX a apoptose foi observada em todas as linhagens deficientes no reparo de DNA, sendo menos pronunciada na linhagem proficiente MRC5. A DNR aumentou discretamente o percentual de células apoptóticas em todas as linhagens.



**Fig. 2.** DOX e DNR levam à morte celular. Células proficientes MRC5 (A), e deficientes em CSB (B), XPA (C) e XPD (D) são expostas às concentrações indicadas de DOX e DNR por 72 h, e então marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo e avaliados por citometria de fluxo. CN = Controle Negativo. Significativamente diferente em relação à linhagem MRC5 \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Interessantemente, apesar de as linhagens XPA e CSB (Fig. 2 B e 2C) mostrarem sensibilidade similar à selvagem ao tratamento com DNR no MTT, apresentaram um percentual significativo de células apoptóticas neste ensaio. A linhagem deficiente em CSB apresenta o maior percentual de células apoptóticas para as duas drogas utilizadas, enquanto XPD é a única a apresentar um aumento de marcação com IP no tratamento com DNR, sugerindo que um percentual dessas células tenha morrido por necrose. Portanto, é possível inferir que o envolvimento ativo do NER (especificamente das proteínas XPA, CSB e XPD) no reparo eficiente das lesões causadas pelos tratamentos com DNR e DOX é essencial para evitar apoptose.

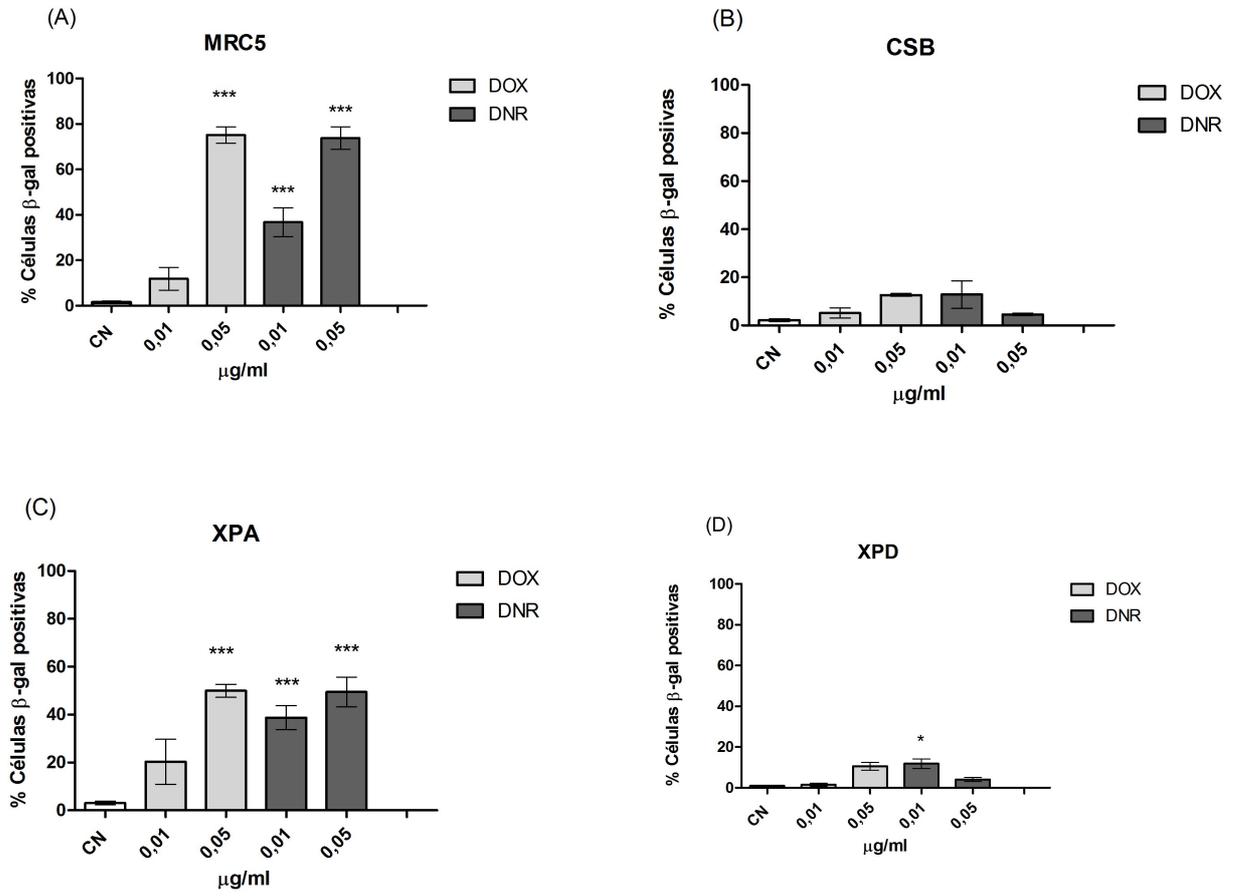
### *3.3. Senescência é observada após o tratamento com DOX e DNR nas linhagens MRC5 e XPA, mas não em XPD e CSB*

Indução de senescência tem sido observada em várias linhagens celulares tratadas com DOX e DNR [24-26]. Para investigar se as linhagens deficientes e proficientes no NER tratadas com DOX e DNR apresentam um fenótipo senescente, avaliou-se a atividade da  $\beta$ -galactosidase ácida, um marcador bioquímico da acidificação dos lisossomos [22]. Tanto o tratamento com DNR como com DOX, produziu um aumento significativo, em relação ao controle não tratado, no percentual de células  $\beta$ -galactosidase positivas (SA- $\beta$ -gal). Este aumento foi dose-dependente na linhagem MRC5 e na linhagem deficiente em XPA (cerca de 70% e 50% na concentração de 0,05 $\mu$ g/ml, respectivamente) para as duas drogas (Fig. 3). Interessantemente, as linhagens deficientes em CSB e XPD (Fig. 3), apresentam um percentual menor que 20% de células  $\beta$ -galactosidase positivas (SA- $\beta$ -gal), em todos os tratamentos utilizados. Esses dados foram confirmados pela análise de morfologia nuclear (Fig. 4), realizada através da visualização dos núcleos corados com DAPI no programa ImageJ e submetidos ao *plugin* NII [23]. Neste ensaio observou-se o mesmo padrão de resposta encontrada na análise da atividade da  $\beta$ -galactosidase para todas as linhagens, exceto para o tratamento com 0,05 mg/ml DOX na linhagem CSB e XPD, o que pode ser explicado se considerarmos o n pequeno que foi utilizado e que o número de eventos em cada análise foi diferente, sem desconsiderar ainda a possibilidade de serem subpopulações. Entretanto, o percentual menor de células em senescência, em relação ao ensaio com  $\beta$ -gal, indica que as células precisam de um tempo maior para responder com o mecanismo de senescência, ou ainda que acúmulo de lisossomos/marcadores ácidos ocorra numa fase anterior ao aumento do tamanho nuclear. Esses resultados sugerem um papel importante das proteínas CSB e XPD no processo de

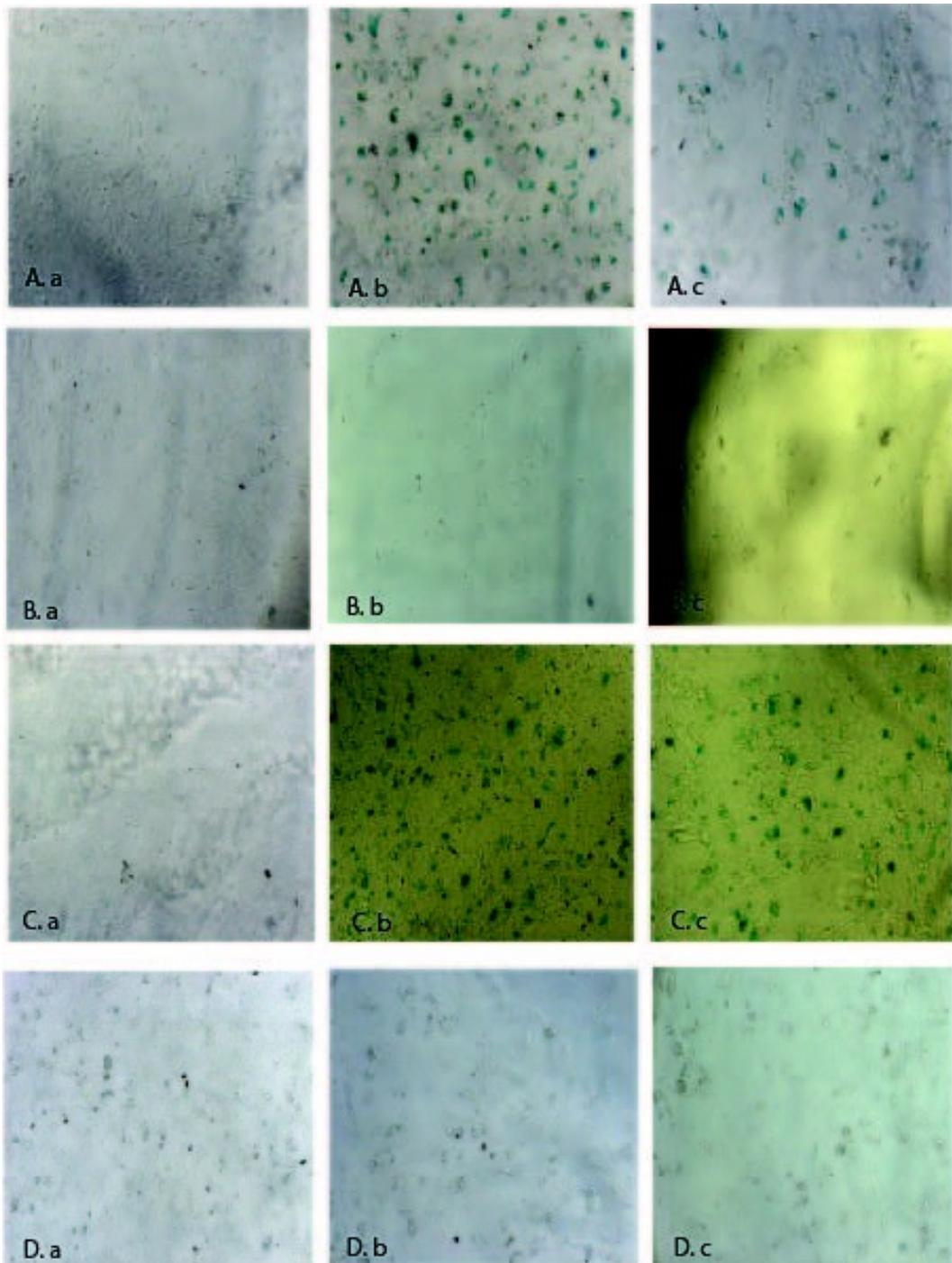
senescência celular nas condições aqui utilizadas.

Além disso, observa-se um pequeno percentual, menor que 10%, de células que sofrem catástrofe mitótica.

A.



**B.**



**Fig. 3.** Indução de senescência pelo tratamento com DOX e DNR. Após tratamento de 72 h com 0,01  $\mu\text{g/ml}$  e 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de DNR e DOX células foram incubadas durante 7 dias em meio livre de droga, e incubadas com solução de coloração SA- $\beta$ -gal. A. Quantificação das células  $\beta$ -gal positivas. Resultados são representados como percentual de células SA- $\beta$ -gal-positivas de pelo menos três

campos de três experimentos independentes. B. Fotografias Representativas ( aumento 100x). A- MRC5, B - CSB, C - XPA, D - XPD, a – Controle negativo, b - 0,01 µg/ml de DOX, c - 0,01 µg/ml de DNR.

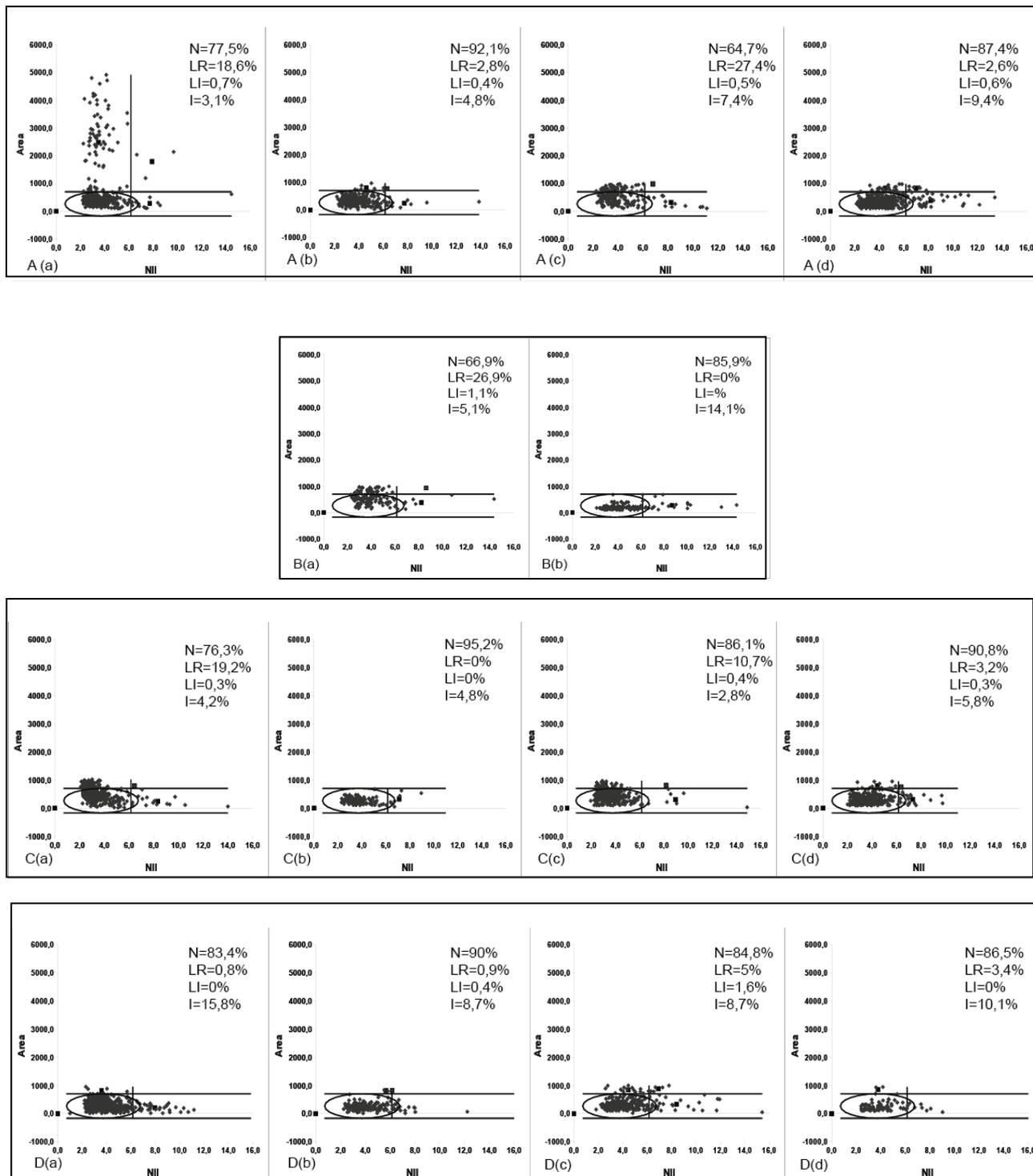
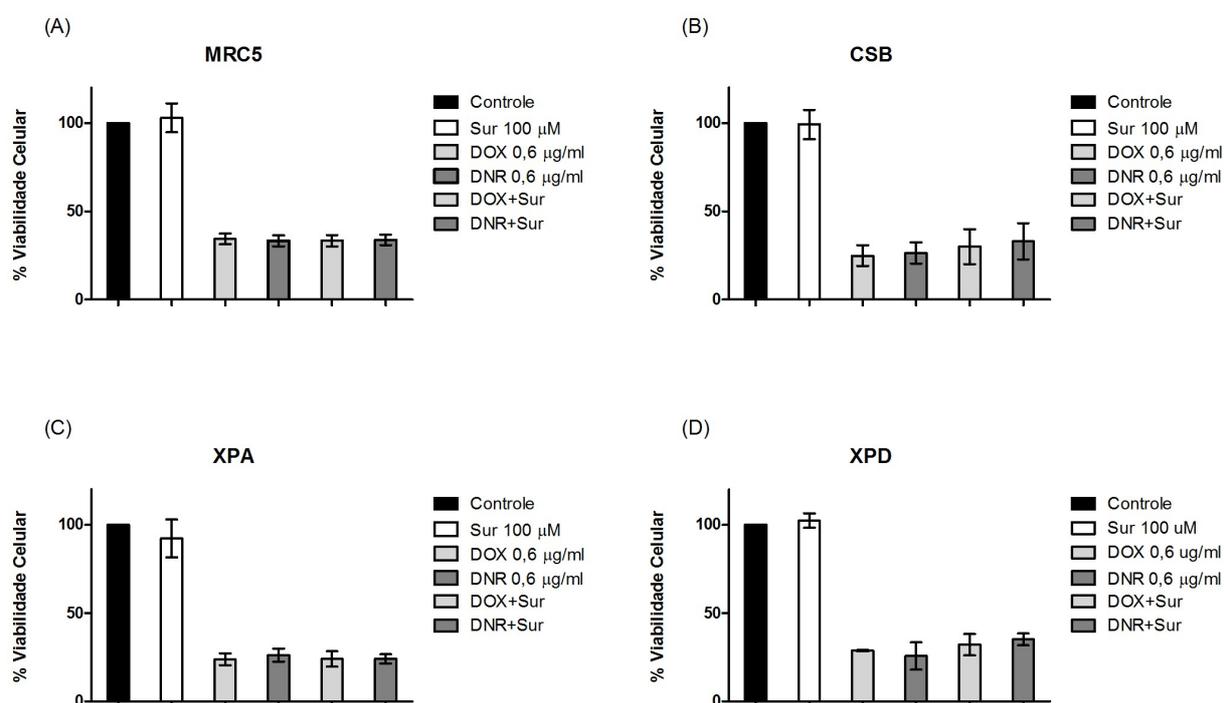


Fig. 4. Análise da Morfologia Nuclear. As células foram tratadas durante 72h com DOX e DNR, e

após coradas com DAPI. Foram obtidas três fotos de campos aleatórios de cada tratamento e analisadas no software Image J submetendo-se o *plugin* NII. Este foi desenvolvido para extrair informações morfométricas sobre os núcleos utilizados na ferramenta NMA. Os parâmetros utilizados geram um Índice de Irregularidade Nuclear (NII) que somado à medição da área nuclear classificam os núcleos como normais (normal, N), irregulares (irregular, I), pequenos e regulares (small and regular, SR), pequenos (small, S), pequenos e irregulares (small and irregular, SI), grandes e regulares (large and regular, LR) ou grandes e irregulares (large and irregular, LI)[23]. Onde foram considerados como senescentes os núcleos LR, e I e LI núcleos que sofreram catástrofe mitótica. (A) MRC5, (B) CSB, (C) XPA, (D) XPD, (a) 0,05 µg/ml de DOX, (b) 0,6 µg/ml de DOX, (c) 0,05 µg/ml de DNR e (d) 0,6 µg/ml de DNR. Os resultados são representados como percentual de células em cada campo.\*\*\*Esse experimento ainda tem resultados preliminares, aqui se utilizou um n=1 com o objetivo de avaliar apenas a senescência, devido à fase experimental foram desconsiderados os núcleos apoptóticos.

### 3.4. Efeitos da Topoisomerase II na sensibilidade ao tratamento com DOX e DNR

A fim de verificar se os efeitos citotóxicos observados nos tratamentos com DOX e DNR são dependentes da inibição da Topoisomerase II empregou-se Suramina, um inibidor catalítico de Topoisomerase II. Como demonstrado na Fig. 5 não foi detectada diferença entre os tratamentos de DNR e DOX com e sem o pré tratamento com Suramina, o que indica que a citotoxicidade observada nas linhagens utilizadas deve estar correlacionada a outros mecanismos de ação dessas drogas como, por exemplo, a formação de adutos no DNA [1].



**Fig. 5.** Inibição catalítica da topoisomerase II. Antes do tratamento com DOX e DNR as células foram pré-tratadas com Suramina (100μM) durante 30 min e após realizou-se o ensaio de MTT. Resultados são expressos como porcentagem do crescimento do controle e representa a média ( $\pm$  erro padrão) de três experimentos independentes. Significativamente diferente em relação ao tratamento sem Suramina \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4. Discussão

As antraciclinas DOX e DNR são extensamente utilizadas na terapia antitumoral e possuem um amplo espectro de ação [2]. Apesar de serem classificadas como inibidoras de topoisomerase II, a atividade dessas drogas não se limita a este mecanismo, podendo gerar diferentes tipos de dano ao DNA como: quebras duplas, pontes inter e intra cadeia, formação de adutos de DNA e radicais livres que podem levar a uma parada no ciclo celular e consecutivamente à apoptose ou senescência [1-3,7,26]. Classicamente o NER é conhecido por sua atividade em reparar danos no DNA que levam a distorções da dupla hélice, como aqueles causados por luz - UV. No entanto, até o momento pouco se sabe sobre o envolvimento do NER e de outros mecanismos de reparo na resposta a drogas antitumorais como DOX e DNR.

Enquanto Spencer et al. [27] demonstrou que após um curto tempo de tratamento (2h-4h) as linhagens de roedores deficientes em XPD, XPB ou XPG (componentes do NER), são mais tolerantes à indução de danos no DNA causados pela DOX, resultados do nosso grupo indicam maior sensibilidade de fibroblastos humanos deficientes em NER após tratamento de 72h [19]. Além do envolvimento da helicase XPD no reparo de lesões induzidas pela DOX foi mostrado também que XPA e XPC são necessários para o reparo efetivo dessas lesões [14,20]. Diversos trabalhos relataram que a resposta à DOX pode se dar por mecanismos como apoptose, autofagia, catástrofe mitótica e senescência [24,25,28,29], sendo que algumas dessas respostas são dependentes da dose. Enquanto doses mais altas levam a morte celular por apoptose, doses mais baixas levam a uma parada no ciclo celular e a indução de senescência [24]. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade de células deficientes no NER ao tratamento com antraciclinas, bem como possíveis diferenças no mecanismo de morte celular por apoptose e/ou senescência.

Demonstrou-se que CSB, XPA e XPD são necessárias para o reparo efetivo de lesões induzidas por DOX, já que as linhagens deficientes nessas proteínas são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do tratamento com DOX comparadas a linhagem proficiente no reparo MRC5 (Figura 1A). Por outro lado, o tratamento com DNR pareceu ser menos citotóxico para as linhagens CSB e XPA nas concentrações usadas, em relação a citotoxicidade induzida em XPD (Figura 1B). Este resultado poderia sugerir o envolvimento de outras vias, além do TCR, no reparo das lesões causadas por DNR. No entanto, o ensaio de Anexina V, para detectar apoptose, mostra um percentual elevado de células apoptóticas nas linhagens CSB, XPA e XPD, tanto para o tratamento com DOX quanto para o tratamento com DNR. A sensibilidade mais baixa ao DNR observada no MTT para linhagem CSB poderia indicar um menor dano mitocondrial em relação ao tratamento

com DOX. O colapso da mitocôndria após tratamento com DOX impediria a metabolização do sal de MTT à Formazan, interferindo com o resultado do teste. Estes resultados indicam a importância das proteínas do NER estudadas para o reparo das lesões causadas por DOX e DNR.

Cutts et al. [1,7] demonstraram que a citotoxicidade da DOX, além da interferência com topoisomerase II, também é devida a formação de adutos no DNA. Para determinar se a sensibilidade dessas linhagens deficientes em NER ao tratamento com DOX e DNR é dependente da inibição da topoisomerase II, formando quebras duplas no DNA [2,26], utilizou-se Suramina, um inibidor catalítico de topoisomerase II [1]. Não foi observada nenhuma diferença na sensibilidade à essas drogas (nas doses utilizadas) na presença da Suramina, o que sugere que este não é o principal efeito responsável pela sensibilidade. Este resultado está de acordo com o encontrado por Saffi et al., 2010 [19], que demonstraram que linhagens XPD silenciadas para Topoisomerasas II continuam sensíveis ao tratamento do DOX. Estes resultados, juntamente com os dados que demonstram a participação do NER no reparo das lesões, sugerem que a formação de adutos no DNA pode ser importante para o efeito citotóxico dos dois agentes.

As antraciclinas DOX e DNR podem desencadear o processo de senescência celular por induzirem dano ao DNA [25,26, 30]. Aqui, demonstrou-se que as linhagens MRC5 e XPA (Fig. 3 e 4) exibem esse tipo de fenótipo após o tratamento com DOX ou DNR. Surpreendentemente, nas linhagens CSB e XPD, uma porcentagem baixa de células apresentaram fenótipo senescente nos tratamentos com DOX e DNR nas condições do experimento (percentual menor que 20%), o que sugere um papel importante de XPD e CSB no processo de senescência celular.

Alguns dados sugerem que um sistema de reparo ativo tenha papel em suprimir a senescência por reparar as lesões no DNA e impedir a sinalização para a senescência, mecanismo pelo qual células tumorais poderiam sobreviver e escapar da senescência [31]. Por outro lado, algumas células tumorais são impedidas de entrar em senescência, mas podem morrer por apoptose. Di Micco et al. [32] demonstraram que linhagens deficientes na resposta ao dano no DNA (DDR) em que CHK2 é estavelmente inibida, não são capazes de entrar em senescência induzida por oncogenes (OIS) quando o oncogene Ras é expresso. Este resultado sugere que o reconhecimento, assim como uma correta resposta ao dano no DNA são importantes, senão fundamentais, para o desenvolvimento do processo de senescência.

Além do seu papel no NER, a proteína XPD também participa de outros processos fundamentais como a transcrição e o controle do ciclo celular, agindo como um regulador da proliferação celular. Estudos em *Drosophila* indicam que baixos níveis de XPD, facilitam a progressão da mitose [33]. Além disso, quando super expressa, XPD causou uma parada no ciclo celular, bem como o seu silenciamento resultou no aumento da taxa de divisões celulares [34].

Durante a resposta ao dano no DNA, altos níveis de XPD assegurariam a integridade do complexo TFIIH suportando o reparo, e ao mesmo tempo preveniriam a divisão celular indevida por sequestrar o complexo ativador de ciclinas CAK. Esses resultados estão de acordo com os encontrados aqui, em que células deficientes em XPD não apresentaram fenótipo senescente, sugerindo que essas células continuam a proliferar mesmo com DNA danificado, levando a morte por necrose. Esse resultado precisa ser confirmado com ensaios de proliferação, como *population doubling time* (PDT) ou ensaio clonogênico.

A alta incidência de câncer de pele nos pacientes XP [35] poderia ser resultante da incapacidade dessas células entrarem em senescência. Não há relatos sobre o papel de CSB na proliferação celular, a ausência de fenótipo senescente nessa linhagem poderia ser explicada pelo fato de CSB ter papel no reconhecimento da lesão e no recrutamento do complexo TFIIH [10]. Pacientes com Síndrome de Cockayne têm como característica um envelhecimento precoce devido problemas na transcrição e à indução de apoptose pelo acúmulo de danos, que levam ao declínio funcional [36]. A toxicidade de lesões que bloqueiam a síntese de RNA pode ser devido ao impedimento da transcrição de genes essenciais e a diminuída quantidade de RNA polimerases que ficam trancadas nos sítios lesionados. As proteínas específicas de TCR, CSA e CSB, junto com os componentes do TFIIH (XPB e XPD) e XPG, têm papel na remoção da polimerase trancada e recrutamento da maquinaria de reparo [37, 38]. Problemas na transcrição em linhagens XPD e CSB podem estar relacionados com a indução de apoptose e também com a falta de sinalização para entrada em senescência no nosso estudo. Embora as linhagens que derivam de pacientes CS não apresentam fenótipo senescente, processos como quiescência e apoptose também são desencadeados pelos processos que levam a senescência e contribuem para o envelhecimento fisiológico [39].

Assim como em Di Micco [32], demonstrou-se aqui que a resposta ao dano no DNA, bem como seu reconhecimento e posterior recrutamento dos fatores de reparo, são necessários para a indução de senescência celular. No entanto, com a limitação de dados obtidos, é difícil elucidar uma via ou uma cascata de sinalizadores pela qual o reparo e a senescência estão interligados.

Os resultados apresentados sugerem um papel importante do NER na resistência ao tratamento com antraciclina encontrada na terapia clínica, bem como a relevância de se investigar os mecanismos que levam a célula a escapar de morte celular e se transformar em célula tumoral de forma conjunta.

## **Agradecimentos**

Essa pesquisa foi financiada pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil) e pela FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

## Referências

- [1] L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, S.M. Cutts, Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death, *Cancer Res.* (2006) 4863-4871.
- [2] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol Rev.* (2004) 185-229.
- [3] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.* (1999) 727-741.
- [4] C. Munger, A. Ellis, K. Woods, J. Randolph, S. Yanovich, D. Gewirtz, Evidence for inhibition of growth related to compromised DNA synthesis in the interaction of daunorubicin with H-35 rat hepatoma, *Cancer Res.* (1988) 2404-2411.
- [5] A. Di Marco, R. Silvestrini, S. Di Marco, T. Dasdia, Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells, *J. Cell Biol.* (1965) 545-550.
- [6] E. Feinstein, E. Canaani, L.M. Weiner, Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by Adriamycin, *Biochemistry* (1993) 13156-13161.
- [7] S.M. Cutts, A. Nudelman, A. Rephaeli, D.R. Phillips, The power and potential of doxorubicin-DNA adducts, *IUBMB Life* (2005) 73-81 .
- [8] S.M. Cutts, L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, Recent advances in understanding and exploiting the activation of anthracyclines by formaldehyde. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* (2005) 431-447.
- [9] M. Christmann, M.T. Tomicic, W.P. Ross, B. Kaina, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193 (2003) 3-34.
- [10] D. Tantin, RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIIH components xeroderma pigmentosum B and p62, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 27794-27799.
- [11] S.C. Shuck, E.A. Short, J.J. Turchi, Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology, *Cell Research* (2008) 64-72.
- [12] R.M. Costa, V. Chigancas, R.S. Galhardo, H. Carvalho, C.F.M. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* (2003) 1083-1099.

- [13] P.C. Hanawalt, Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation, *Oncogene* (2002) 8949–8956.
- [14] H. Carvalho, L.M. Garrido, R.L.A. Furlan, G. Padilha, M. Agnoletto, T. Guecheva, J.A.P. Henriques, J. Saffi, C.F.M. Menck, DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2010) 989–994.
- [15] S. Lagerwerf, M.G. Vrouwe, R.M. Overmeer, M. I. Fousteri, L. H.F. Mullenders, DNA damage response and transcription, *DNA Repair* (2011) 743-750.
- [16] A. Sary, A. Sarasin, The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome, *Biochimie* (2002) 49–60.
- [17] J. Boer, J.H. Hoeijmakers, Nucleotide excision repair and human syndromes, *Carcinogenesis* 21 (2000) 453-460.
- [18] P.H. Itin, A. Sarasin, M.R. Pittelkow, Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes, *J. Am. Acad. Dermatol.* 44 (2001) 891–920.
- [19] J. Saffi, M.H. Agnoletto, T.N. Guecheva, L.F. Batista, H. Carvalho, J.A. Henriques, A. Sary, C.F. Menck, A. Sarasin, Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells, *DNA Repair* 9 (2010) 40-47.
- [20] M.C. Moraes, A.Q. Andrade, H. Carvalho, T.N. Guecheva, M.H. Agnoletto, J.A. Henriques, A. Sarasin, A. Sary, J. Saffi, C.F. Menck, Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions, *Cancer Lett.* 1(2012) 108-118 [Epub 2011 Sep 24].
- [21] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [22] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scortt, C. Roskelley, E.E. Medranos, M. Linskens, I. Rubeljii, O.P. Smithii, M. Peacocket, J. Campisi, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 9363-9367.
- [23] E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski, S.M.C. Jacques, V.D. Silva, G. Lenz, Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of apoptosis, mitosis, senescence and mitotic catastrophe. A ser submetido no periódico Plos One.
- [24] Y.W. Eom, M.A. Kim, S.S. Park, M.J. Goo, H.J. Kwon, S. Sohn, W.H. Kim, G. Yoon, K.S. Choi, Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype, *Oncogene* 24 (2005) 4765-4777.
- [25] X. Di, R.P. Shiu, I.F. Newsham, D.A. Gewirtz, Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 1139-1150.
- [26] S. Mansilla, B. Piña, J. Portugal, Daunorubicin-induced variations in gene transcription:

- commitment to proliferation arrest, senescence and apoptosis, *Biochem. J.* 372 (2003), 703–711.
- [27] D.M. Spencer, R.A. Bilardi, T.H. Koch, G.C. Post, J.W. Nafie, K. Kimura, S.M. Cutts and D.R. Phillips, DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair, *Mutat. Res.*, 638 (2008), 110–121.
- [28] Y. Wang, G. Blandino, D. Givol, Induced p21<sup>waf</sup> expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin, *Oncogene* 18 (1999) 2643-2649.
- [29] B.D. Chang, Y. Xuan, E.V. Broude, H. Zhu, B. Schott, J. Fang J, I.B. Roninson IB, Role of p53 and p21<sup>waf1/cip1</sup> in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs, *Oncogene* 18 (1999) 4808-4818.
- [30] S. Cho, J. Park, E.S. Hwang, Kinetics of the cell biological changes occurring in the progression of DNA damage-induced senescence, *Mol. Cells* 32 (2011) 539-546.
- [31] L.G. Larsson, Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence, *Semin. Cancer Biol.* (2011) [Epub ahead of print].
- [32] R. Di Micco, M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, F.A. Fagagna, Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication, *Nature*, 444 (2006) 638-642.
- [33] J. Chen, S. Larochelle , X. Li, B. Suter, Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression, *Nature* 424(2003) 228-232.
- [34] E. Cameroni, K. Stettler, B. Suter, On the traces of XPD: cell cycle matters – untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations, *Cell Div.* 5 (2010) doi: 10.1186/1747-1028-5-24.
- [35] A.R. Lehmann, D. McGibbon, M. Stefanini, Xeroderma pigmentosum, *Orphanet J. Rare Dis.* 6 (2011) [Epub ahead of print] .doi:10.1186/1750-1172-6-70
- [36] A.A. Freitas, J. P. Magalhães, A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing, *Mut. Res.* 728 (2011) 12–22.
- [37] J. R. Mitchell, J. H. J. Hoeijmakers, L. J. Niedernhofer, Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 232–224.
- [38] L.J. Flores-Alvarado, S.A. Ramirez-Garcia, N.Y. Núñez-Reveles, The metabolic and molecular bases of Cockayne syndrome, *Rev. Invest. Clin.* 62 (2010) 480-490.
- [39] M. Collado, M.A. Blasco, M. Serrano, Cellular senescence in cancer and aging, *Cell*, 130 (2007) 223-333.



### III. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o sistema de reparo por excisão de nucleotídios (NER) exerce um papel importante no processamento das lesões induzidas pelas antraciclina Doxorubicina e Daunorrubicina em fibroblastos humanos, bem como o provável envolvimento de CSB e XPD na sinalização de indução senescência celular. Mais especificamente, pode-se concluir que:

- As linhagens celulares CSB, XPA e XPD apresentam uma maior sensibilidade tanto à DOX, como à DNR em relação à linhagem MRC5.
- Essas mesmas linhagens em grande parte morrem pelo mecanismo de apoptose, quando tratadas com DOX e DNR.
- As linhagens MRC5 e XPA são induzidas à senescência celular perante os tratamentos utilizados.
- DOX e DNR não induzem senescência em CSB e XPD, o que pode ser devido ao envolvimento destas proteínas no processo de transcrição celular e na sinalização indutora de senescência.
- A maior sensibilidade das linhagens deficientes no NER aos tratamentos com DOX e DNR é independente da inibição da topoisomerase II.

#### IV. PERSPECTIVAS

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

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

- Realizar os ensaios com a linhagem XPC, deficiente apenas em GGR;
- Realizar o ensaio clonogênico e *population doubling time* após os tratamentos com as drogas;
- Observar a indução de senescência nestas linhagens com outros agentes;
- Avaliar a expressão de p53, p21, p16 e mTOR, a fim de se poder identificar uma via de sinalização que possa estar envolvida nos processos de morte celular e senescência observados;
- Realizar novamente a análise de morfologia nuclear (NMA) excluindo-se os erros e também com doses menores;
- Avaliar o ciclo celular, permitindo a visualização da parada do mesmo.
- Transfectar as linhagens celulares com o oncogene Ras, para observar se as linhagens deficientes no NER entram em senescência perante este estímulo.

## V. REFERÊNCIAS

- [1] J. R. Mitchell, J. H. J. Hoeijmakers, L. J. Niedernhofer, Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 232–224.
- [2] J-H. Chen, C.N. Halesy, S.E. Ozanne, DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucl. Acids Res.* 35 (2007) 7417-7428.
- [3] J. A. Eisen, P.C. Hanawalt, A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes, *Mutat. Res.* 435 (1999) 171-213.
- [4] G. Slupphaug, B. Kavli, H.E. Krokan, The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat. Res.* 531 (2003) 231-251.
- [5] T. Bohgaki, M. Bohgaki, R. Hakem, DNA double-strand break signaling and human disorders, *Genome Integr.* 1 (2010) [Published online] doi:10.1186/2041-9414-1-15.
- [6] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol Rev.* 56 (2004) 185-229.
- [7] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 727–741.
- [8] L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, S.M. Cutts, Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death, *Cancer Res.* 66 (2006) 4863-4871.
- [9] L. Liu, J. Lee, P. Zhou, Navigating the Nucleotide Excision Repair Threshold, *J. Cell Physiol.* 224 (2010) 585-589.
- [10] M. Christmann, M. T. Tomicic, W. P. Roos, B. Kaina, Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 15 (2003) 3-34.
- [11] M. Fousteri, L. H. Mullenders, Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects, *Cell Res.* 18 (2008) 73- 84.
- [12] R. M. Costa, V. Chiganças, R. da S. Galhardo, H. Carvalho, C. F. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie.* 85 (2003) 1083-1099.
- [13] S. Tornaletti, Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1010 – 102.

- [14] A. Aboussekhra, M. Biggerstaff, M. K. K. Shijvi, J. A. Vilpo, V. Moncollin, V. N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J. M. Egly, R. D. Wood, Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components, *Cell* 80 (1995) 859 – 868.
- [15] P. C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription- coupled DNA repair: two decades of progress and surprises, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 958- 970.
- [16] F. Coin, V. Oksenysh, J. M. Egly, Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair, *Mol. Cell.* 26 (2007) 245-256.
- [17] M. Missura, T. Buterin, R. Hindges, U. Hübscher, J. Kaspárková, V. Brabec, H. Naegeli, Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO J.* 20 (2001) 3554-3564.
- [18] S. Lagerwerf, M. G. Vrouwe, R. M. Overmeer, M.I. Fousteri, L.H.F. Mullenders, DNA damage response and transcription, *DNA Repair* 10 (2011), 743-750.
- [19] E. Camerini, K. Stettler, B. Suter, On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations, *Cell Division* 5 (2010) doi:10.1186/1747-1028-5-24.
- [20] T. Nospikel, Nucleotide excision repair: variations on versatility, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 994 – 100.
- [21] A.R. Lehmann, D. McGibbon, M. Stefanini, Xeroderma pigmentosum, *Orphanet J. Rare Dis.* 6 (2011) [Epub ahead of print] .doi:10.1186/1750-1172-6-70
- [22] A. R. Lehmann, The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases, *Genes Dev.* 15 (2001)15-23.
- [23] E. Bergmann, J. M. Egly, Trichothiodystrophy, a transcription syndrome, *Trends Genet.* 17 (2001) 279-286.
- [24] Y. Fuchs, H. Steller, Programmed cell death in animal development and disease, *Cell.* 147 (2011) 742-758.
- [25] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El -Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.* 16 (2009) Epub 2008 Oct 10 doi:10.1038/cdd.2008.150.
- [26] L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M.

- Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H-U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zivnotovsky, G. Melino, G. Kroemer, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death Differ.* (2011) [Epub ahead of print] doi: 10.1038/cdd.2011.96
- [27] J.M. Adams, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis, *Genes Dev.* 17 (2003) 2481-2495.
- [28] M.C. Moraes, A.Q. Andrade, H. Carvalho, T.N. Guecheva, M.H. Agnoletto, J.A. Henriques, A. Sarasin, A. Stary, J. Saffi, C.F. Menck, Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions, *Cancer Lett.* 1(2012) 108-118 [Epub 2011 Sep 24].
- [29] M.E. Leonart, A. Artero-Castro, H. Kondoh, Senescence induction; a possible cancer therapy. *Mol. Cancer*, 8 (2009) doi:10.1186/1476-4598-8-3 .
- [30] M.C. Caino, J. Meshki, M.G. Kazanietz, Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players, *Apoptosis* 14 (2009) 392-408.
- [31] J. Campisi, F. A. Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 729-740.
- [32] A. Rebbaa, X. Zheng, P.M. Chou, B.L. Mirkin, Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence, *Oncogene* 2(2003) 2805–2811.
- [33] S. Mansilla, B. Piña, J. Portugal, Daunorubicin-induced variations in gene transcription: commitment to proliferation arrest, senescence and apoptosis, *Biochem. J.* 372 (2003), 703–711.
- [34] M. Collado, M. Serrano, The power and the promise of oncogene-induced senescence markers, *Nature Rev. Cancer* 6 (2007) 472-476.