



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**



**ESTUDO DE LESÕES E REPARO DE DNA EM PACIENTES COM  
CÂNCER DE MAMA E EM FIBROBLASTOS HUMANOS**

**Mateus Hermes Agnoletto**

Dissertação apresentada  
ao programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em  
Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora: Dra. Jenifer Saffi**

**Porto Alegre**

**2006**

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica desta Universidade e no Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP-SP). Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Aos meus pais,  
Armando e Clereci, pelo apoio,  
confiança e dedicação. O amor e  
carinho foram ferramentas cruciais  
para a construção dessa etapa de  
minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Jenifer Saffi, primeiramente pela oportunidade oferecida. Pela orientação durante todo o meu mestrado, além da amizade desencadeada nesse período de convivência. A confiança, bem como os conhecimentos compartilhados, foram de suma importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Temenouga Guesheva, a Nusha, que foi a pessoa responsável pela minha inserção nesse grupo de pesquisa. Foi ela que me transmitiu os primeiros votos de confiança a nível científico. Obrigado pela amizade e pelo grande conhecimento repassado.

Ao professor Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pela oportunidade oferecida e pela amizade e confiança compartilhada.

Ao professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck, primeiramente pelo acolhimento em seu laboratório, seguido do grande conhecimento compartilhado. A amizade e a confiança foram fundamentais para o sucesso desse trabalho.

Aos professores, membros da minha Comissão de Acompanhamento, Dr. Guido Lenz e Dra. Fabiana Horn, pela atenção e colaboração.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Agradecimentos especiais ao Luciano Saucedo e a Silvia Centeno, pelo grande apoio e atenção prestados durante o período do desenvolvimento desse projeto.

A Márcia Vaz pela disponibilidade prestada, além do grande companherismo.

Aos funcionários do Departamento de Biofísica.

A todos os colegas e amigos de laboratório: Dinara, Giovanni, Renato, Diego, Fernanda, Cláudio, Cassiana, Jaqueline, Luis Fernando, Renata, Fabrício, Albanin, Knulp, Ana Ziles, Ana Catarina, Betina, Nicolas, Rafael, Duda e Iuri. Estes agradecimentos são especiais, pois tais pessoas forneceram um ambiente agradável e amigável para o desenvolvimento desse trabalho, o que facilitou a superação de obstáculos pertinentes ao desenvolvimento de um projeto de mestrado.

Às colegas do Laboratório de Genotoxicidade: Isabel, Miriana e Mirian.

A todos os colegas do Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP/SP: Keronim, Daniela, Wanessa, Vanessa Sato, Luis, Rodrigo, Ricardo, André,

Regina, Valéria, Helen, Melissa, Raquel, Alice, Carol Berra, Carol Quayle, Maria Helena, Marinalva, Tatiana, Helotônio e Renata. A amizade desenvolvida com essas pessoas, em tão pouco tempo, foi impressionante. São pessoas que ajudaram não somente na minha formação acadêmica, me passando conhecimento, mas também trouxeram-me um grande aprendizado pessoal.

Ao Fábio e a Adriana, pela disponibilidade e ajuda em muitas etapas desse trabalho. Esses agradecimentos estendem-se ao Hospital de Caridade de Ijuí.

A Fernanda Dondé, “minha” primeira aluna de iniciação científica. Pela amizade, companherismo e pela grande ajuda prestada durante esse período. Estou crescendo muito com essa orientação. Acredito que estou aprendendo mais do que ensinando.

Aos meus GRANDES amigos: Tomaz, Rovian, Cássio e Gustavo. Todos vocês foram peças fundamentais para eu alcançar esse objetivo. Grandes noites de conversas, churrasco e, claro, aquela cervejinha gelada. Sempre que precisei, vocês estavam lá, prontos para ajudar, o meu muito obrigado por tudo.

Um parágrafo especial ao meu melhor amigo, meu irmão André. O agradecimento a essa pessoa torna-se complicado, pois faltariam páginas para descrever tamanha gratidão a ele. André, meu muito obrigado por tudo que você já fez por mim, e ainda, pela grande ajuda que você me deu nesse mestrado. Você e eu sabemos que, sem tua ajuda, eu não teria começado, e muito menos terminado esse mestrado.

Aos meus pais, Armando e Clereci. Inicialmente pessoas que me incetivaram a lutar e buscar meus sonhos. Forneceram-me o combustível fundamental para isso, o amor. Agora, terminando mais essa etapa de minha vida, reconheço que a educação fornecida por vocês, bem como o apoio dado em todos os momentos, foram cruciais para a realização desse meu projeto. Muito obrigado, esse título também é de vocês.

A Fernanda Bianchini, uma pessoa que sempre esteve no meu lado, fornecendo-me carinho e respeito. Meu muito obrigado pela confiança, e claro, pela paciência que você teve durante todo esse período.

A todos que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho.

Obrigado.

## ÍNDICE GERAL

Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	ix
Abreviaturas .....	x
Resumo .....	xii
Absract .....	xiii
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Câncer .....	1
1.1. Espécies reativas de oxigênio e perfil antioxidante .....	4
1.2. Biomarcadores Tumoriais .....	6
1.3. Sinalização Celular .....	8
2. Mecanismos de reparo de danos no DNA .....	11
3. Apoptose .....	18
4. Doxorrubicina .....	19
5. Novas estratégias da Terapia Anti-Tumoral .....	21
<b>II – OBJETIVOS</b> .....	22
1. Objetivos Gerais .....	22
2. Objetivos Específicos .....	22
<b>III – CAPÍTULO I</b> .....	23
“DNA Damage and Antioxidant Status in Peripheral Blood Lymphocytes from Breast Cancer Patients” .....	23

<b>IV – CAPÍTULO II</b> .....	47
“Cell cycle and DNA damage evaluation in XPD deficient fibroblasts treated with the anti-neoplastic drug doxorubicin” .....	47
<b>V – DISCUSSÃO GERAL</b> .....	70
1. Análise dos danos no DNA e do perfil antioxidante de pacientes com câncer de mama .....	70
2. Efeito da DOX em fibroblastos deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos .....	73
<b>VI – CONCLUSÕES</b> .....	78
1. Capítulo 1 .....	78
2. Capítulo 2 .....	78
<b>VII – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80
<b>VIII – PERSPECTIVAS</b> .....	81
<b>IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>X – ANEXOS</b> .....	89

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.</b> Imunohistoquímica para proteína cerb-2 .....	7
<b>Figura 2.</b> Reconhecimento e sinalização de danos no DNA .....	10
<b>Figura 3.</b> Reparo por erro de emparelhamento .....	12
<b>Figura 4.</b> Reparo por excisão de bases .....	13
<b>Figura 5.</b> Pacientes com XP (a), TTD (b) e CS (c) .....	14
<b>Figura 6.</b> Reparo por excisão de nucleotídeos .....	15
<b>Figura 7.</b> Reparo por recombinação não-homóloga .....	17
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da doxorubicina .....	20
<b>Figura 9.</b> Estrutura química de um aduto de DNA formado pela DOX .....	20

### CAPÍTULO I

<b>Figure 1.</b> DNA damage in peripheral lymphocytes .....	42
<b>Figure 2.</b> Repair Efficacy to H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and MMS induced lesions .....	43
<b>Figure 3.</b> Antioxidant status .....	44
<b>Figure 4.</b> Correlation between DNA damage and antioxidant status .....	45

### CAPÍTULO II

<b>Figure 1.</b> Apoptosis induction after treatment with DOX .....	64
<b>Figure 2.</b> Cell cycle analysis after DOX treatment .....	65
<b>Figure 3.</b> Free radicals are not involved in DOX-induced apoptosis .....	66
<b>Figure 4.</b> DOX induced DNA damage in a dose dependent manner .....	67
<b>Figure 5.</b> Kinetics of DNA damage removal after DOX treatment .....	68
<b>Figure 6.</b> Doxorubicin induces $\gamma$ H2AX foci in normal and XPD deficient fibroblasts .....	69

### DISCUSSÃO

<b>Figura 10.</b> Modelo proposto para o mecanismo de ação da DOX .....	77
---	----



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Expression of some biomarkers in breast tissue of cancer women by immunohistochemistry .....	46
---	----

## ABREVIATURAS

ATM	Ataxia Telangiectasia mutada
ATP	adenosina trifosfato
ATR	Ataxia Telangiectasia relacionada Rad3
BER	reparo por excisão de bases
BRCA 1	breast cancer 1
BRCA 2	breast cancer 2
CAT	catalase
CPD	dímeros de ciclobutano pirimidina
CS	Síndrome Cokayne
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOX	doxorrubicina
DSB	quebras de dupla fita
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
ER	receptor de estrógeno
ERO	espécies reativas de oxigênio
FACS	citometria de fluxo
Fe (II)	ferro (II)
GPx	glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HR	recombinação homóloga
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MBC	câncer de mama metastático
MDA	malonilaldeído
MMR	reparo por erro de emparelhamento
MMS	metil-metano sulfonato
NAC	N-acetilcisteína
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	recombinação não homóloga

OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-OH
PR	receptor de progesterona
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
SOD	superóxido desmutase
TBARS	ácido tiobarbitúrico
TFIIH	fator transcricional IIIH
TLS	síntese translesão
topoII	topoisomerase II
TT	timina-timina
TTD	Tricotiodistrofia
UV	ultravioleta
XP	Xeroderma Pigmentoso

## RESUMO

O câncer de mama é o mais freqüente tipo de câncer entre mulheres e representa a segunda causa de morte dentre elas (após o câncer de pulmão). O deterioramento do perfil antioxidante (atividade de SOD e CAT) e/ou do reparo de DNA podem elevar os riscos de uma transformação maligna, devido ao acúmulo de mutações espontâneas em genes importantes nos processos tumorais. Neste trabalho, foram determinados (capítulo 1) os níveis de danos no DNA, endógenos e induzidos por peróxido de hidrogênio, em linfócitos de sangue periféricos de pacientes com câncer de mama, e também se analisou o perfil antioxidante do plasma desses indivíduos. Os resultados demonstraram claramente uma relação entre os níveis de danos endógenos no DNA e a atividade de SOD, onde altos níveis de danos endógenos estão correlacionados com uma baixa atividade dessa enzima. Além disso, as pacientes apresentaram uma menor capacidade de reparo aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, quando comparados com os controles. Sabe-se que muitas drogas quimioterápicas (como doxorubicina) têm como alvo o DNA, com isso a citotoxicidade desses agentes está diretamente relacionada com sua habilidade de causar danos no material genético. Os mecanismos de reparo de danos no DNA constituem um dos tópicos mais interessantes na biologia moderna, uma vez que as proteínas inseridas nesses processos podem estar envolvidas na manutenção da integridade genômica, assim como na resistência de certos tumores a estratégias de terapia antitumoral. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é um mecanismo de reparo altamente conservado que envolve mais de 30 proteínas, dentre elas a proteína XPD, a qual é uma subunidade do complexo TFIIH, envolvido nos processos de transcrição e reparo. Assim, no capítulo 2, foi determinada a sensibilidade de três linhagens de fibroblastos humanos deficientes no gene XPD à doxorubicina (DOX). Os resultados apresentados nesse capítulo mostraram a maior sensibilidade das linhagens XPD e XP/CS quando comparados com TTD e MRC5 (linhagem normal), assim como a indução de *foci* de  $\gamma$ H2AX (indicativo de quebras de dupla fita) pela DOX de forma tempo dependente. Com os resultados obtidos nesse trabalho é possível enfatizar a utilização de linfócitos de sangue periférico para o monitoramento de genotoxicidade a terapias antitumorais, bem como sugerir a participação do NER no reparo de lesões causadas por DOX.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy among women and it is the second cause of death among them (after lung cancer). Impaired antioxidant status and/or DNA repair may elevate the risk of malignant transformation of breast cells due to the accumulation of spontaneous mutations in target genes in tumor processes. In this work, we have determined (chapter 1) the DNA damage levels, either endogenous or induced by hydrogen peroxide, in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients, as well as the antioxidant status in the plasma of these individuals. The results clearly showed a relation between endogenous DNA damage levels and SOD activity, where high endogenous damage levels are correlated with low SOD activity. Moreover, the patients presented a lower DNA damage repair capacity to the damages induced by hydrogen peroxide than the controls. It is very well known that many chemotherapeutic drugs (like doxorubicin) target DNA and therefore the cytotoxicity of these agents is directly related to their ability to cause DNA damage. The mechanisms of DNA damage repair are one of the most interesting topics in modern biology, since the proteins that take part in these processes can be involved in both the maintenance of genomic integrity and in the resistance of certain tumors to anti-tumoral strategies. Nucleotide Excision Repair (NER) is a highly conserved repair mechanism that involves more than 30 proteins, among them the XPD protein, which is a subunit of the TFIIH complex, involved both in transcription and repair. Thus, in chapter 2, we have determined the sensitivity of three different human fibroblasts deficient in XPD gene to doxorubicin (DOX). The results showed in this chapter demonstrated a higher sensitivity of XPD and XP/CS cell lines to DOX than TTD and MRC5 (normal cells), as well as the induction of  $\gamma$ H2AX *foci* (indicative of double strand breaks) by DOX in a time-dependent manner. With the results obtained in this work it is possible to emphasize the use of peripheral blood lymphocytes to monitoring genotoxicity to therapies, as well as to suggest the a role of NER in the repair of lesions caused by DOX.

## **I – INTRODUÇÃO**

### **1. Câncer**

O aparecimento de células cancerígenas é acompanhado pela formação de um grande aglomerado de células pré-cancerígenas. Assim, quando um nódulo aparece no corpo, este é somente a ponta de um iceberg, que está maturando no organismo por décadas e que se constitui de células danificadas em diferentes estágios de transformação. Este é um detalhamento filosófico da formação de tumores no organismo humano, descrito por Lichtenstein (2005). O câncer é uma doença que envolve mudanças dinâmicas no genoma, as quais refletem em mutações que acometem genes importantes para manutenção celular, produzindo ganho (oncogene) ou perda de função (genes supressores tumorais) (Hanahan e Weinberg, 2000). Oncogenes e genes supressores tumorais podem contribuir para a progressão do câncer através de alterações na biogênese do ribossomo, sendo que vários estudos têm mostrado que supressores tumorais e oncogenes regulam a função do ribossomo. Alterações na maquinaria de síntese protéica podem ser responsáveis por doenças que aumentam a suscetibilidade ao câncer (Ruggero e Pandolfi, 2003). Ao contrário de muitas outras doenças que possuem “perda de funções” como Doença de Alzheimer ou diabetes, a célula cancerígena é selecionada para um “ganho de função”, ou seja, essa doença adquire numerosas funções, incluindo a habilidade de adaptação a mudanças no meio ambiente e ainda, tem grande capacidade de sobreviver ao redor de células normais, sendo que, muitas vezes, o crescimento tumoral é visto como o desenvolvimento de um “órgão” especial (Lichtenstein, 2005). Várias evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo que envolve vários passos e que esses refletem em alterações genéticas que guiam a progressiva transformação de células humanas. Algumas alterações, como sinais de crescimento auto suficientes, não sensibilidade a inibidores de crescimento, perda da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo sem limite, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, são essenciais e podem explicar a grande diversidade dos cânceres e tumores, as quais determinariam o crescimento maligno (Hanahan e Weinberg, 2000).

O câncer de mama é o tipo mais freqüente de câncer entre mulheres e representa a segunda causa de morte dentre elas (após o câncer de pulmão) (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, estima-se que 50.000 novos casos de

câncer de mama ocorrerão em 2006 no Brasil. No Rio Grande do Sul há 88,81 casos para cada 100.000 mulheres ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)).

Baseado em estudos epidemiológicos de diferentes populações os fatores de riscos para o câncer de mama incluem: idade, localização geográfica e perfil socioeconômico, eventos reprodutivos (menarca, menopausa e gravidez), hormônios exógenos (hormônios de reposição hormonal e contraceptivos orais), estilo de vida (obesidade, alcoolismo, dietas, exercícios físicos), história de doenças de mama benignas, radiação ionizante, bem como fatores genéticos, sendo que p53 foi o primeiro gene supressor tumoral a ser correlacionado com o câncer de mama hereditário. (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

A menarca antes dos 12 anos ou depois dos 14 anos está associada com um aumento no risco de câncer de mama em torno de 10-20%, provavelmente em função da prolongada exposição do epitélio da mama a estrógenos e progesterona, devido aos ciclos menstruais. O uso de hormônios após a menopausa aumenta o risco de câncer de mama, dependendo da duração de exposição e se o estrógeno é usado isoladamente ou em combinação com progestinas (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Ma et. al., 2006). O uso de contraceptivos orais aumenta o risco de câncer de mama em 24%, sendo que a idade na qual a mulher inicia o uso desse medicamento tem grande impacto no risco de desenvolver o tumor (início antes dos 20 anos aumenta o risco) (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

Os mecanismos pelos quais o álcool poderia causar o câncer não estão bem esclarecidos, porém sabe-se que ele pode agir através do seu primeiro metabólito, o acetaldeído, um composto bem caracterizado como carcinogênico e mutagênico (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Muito interessante é o aumento de estrogênio em mulheres, quando associado ao consumo de álcool, sendo que isso ocorre tanto na pré-menopausa quanto na pós-menopausa (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

A dieta contém uma grande variedade de carcinógenos e anti-carcinógenos (naturais e químicos), sendo que alguns desses compostos podem agir através da geração de radicais livres, os quais podem levar a danos no DNA. O consumo de carne tem sido associado com o aumento do risco de câncer de mama, provavelmente devido à formação de aminas aromáticas heterocíclicas e outros compostos nocivos produzidos na preparação da carne. A obesidade também está correlacionada com o risco de câncer de mama, devido ao tecido adiposo ser uma importante fonte de estrógenos (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

Mutações em genes que predisõem ao câncer de mama como BRCA1, BRCA2 (Breast Cancer 1 e 2, respectivamente) (Trenz et. al., 2002), p53 (Kroger et. al., 2006), ATM (Ataxia Telangectasia mutada) (Khanna e Chenevix-Trench, 2004), podem conferir risco para o desenvolvimento de câncer hereditário. BRCA1 e BRCA2 são dois genes diretamente relacionados com o câncer de mama hereditário, sendo responsáveis por 80-90% de todos os cânceres de mama hereditários, não sendo muito frequentes em cânceres de mama esporádicos. BRCA1 é um gene supressor tumoral que tem a função de manter a integridade genômica (*caretaker gene*). Mutações nos genes responsáveis pela codificação dos receptores de estrógeno e progesterona também podem aumentar o risco de câncer de mama. (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Polimorfismos em outros genes podem ser relacionados ao risco de desenvolver câncer de mama, como a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (Hu et. al., 2002) e proteínas do NER, como XPD (Clarkson e Wood, 2005).

Aproximadamente 10% das pacientes com câncer de mama diagnosticado têm a doença avançada localmente e/ou apresentam metástase. Passadas mais de três décadas de pesquisa, o câncer de mama metastático (MBC) permanece essencialmente incurável, sendo que após a documentação da metástase, o tempo de sobrevivência média é de aproximadamente dois anos. Atualmente, podem ser usados três diferentes sistemas de tratamento para o câncer de mama avançado: terapia endócrina, quimioterapia e a terapia de alvos biológicos (Bernard-Marty et. al., 2006).



### 1.1. Espécies reativas de oxigênio e perfil antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo normal da célula. Alguns estudos têm estimado que um indivíduo possa apresentar de 10.000-20.000 radicais livres cada célula do corpo todos os dias (Valko et. al., 2004). A hipótese de que os radicais livres possuem um papel importante na carcinogênese provém de estudos *in vitro*, descrevendo seu papel como agente causador de danos DNA (lesões oxidativas), bem como na modificação estrutural e funcional de proteínas e na expressão gênica. (Hussain, 2003; Valko et. al., 2004). O processo inflamatório é uma importante fonte de radicais livres e estes podem induzir numerosas alterações, incluindo mutações gênicas e modificações pós traducionais em proteínas chaves nos processos de manutenção celular, como *checkpoints*, reparo do DNA e apoptose. (Hussain, 2003). Todos as ERO têm capacidade de interagir com componentes celulares, incluindo bases do DNA, produzindo bases danificadas ou quebras da fita. Modificações do material genético resultam em bases oxidadas representando o primeiro passo no processo de mutagênese e envelhecimento (Valko et. al., 2004).

Em condições fisiológicas, a geração de ERO é controlada pelo grande número de sistemas antioxidantes que atuam como protetores contra os mesmos. Esses sistemas consistem de enzimas antioxidantes bem como de antioxidantes não enzimáticos. O balanço entre a produção de ERO e a eficácia dos processos antioxidantes é um fator determinante na formação de danos oxidativos em estruturas celulares e moléculas como lipídeos, proteínas e DNA (Liu et. al., 2003; Tas et. al., 2005). Alguns pesquisadores mostraram que há uma maior produção de ERO em tecidos de câncer de mama, comprovado pelo aumento dos níveis de danos oxidativos, assim como um aumento em malonilaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica (Tas et. al., 2005). Além disso, um aumento de ERO pode induzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes, como SOD (superóxido desmutase) e GPx (glutaciona peroxidase), enquanto a atividade de CAT (catalase) é menor (Tas et. al., 2005). A SOD catalisa a conversão de oxigênio em íon superóxido, sendo que este é detoxificado pela ajuda de GPx e CAT, transformando o peróxido de hidrogênio em água. Os menores níveis de CAT proporcionam um acúmulo de peróxido de hidrogênio e como resultado um aumento na peroxidação lipídica (aumento dos níveis de MDA) (Tas et. al., 2005). Yeh e colaboradores (2005) mostraram que os níveis de TBARS são aumentados no plasma de pacientes com câncer de mama, assim como a atividade das enzimas SOD e GPx.

Porém, outros autores mostram o contrário, ou seja, uma diminuição dos níveis de TBARS (Seven et. al., 1998) e MDA (Gerber et. al., 1989) no plasma de mulheres com câncer de mama. Assim observa-se a importância dessas enzimas como marcadores biológicos de estresse oxidativo. Sendo as ERO altamente danosas às biomoléculas celulares, como membranas (peroxidação lipídica) e DNA (danos oxidativos e quebras das fitas), tais defesas antioxidantes são fundamentais para diminuir as ERO livres nas células e dessa forma manter a integridade celular (Daidone et. al., 2004).

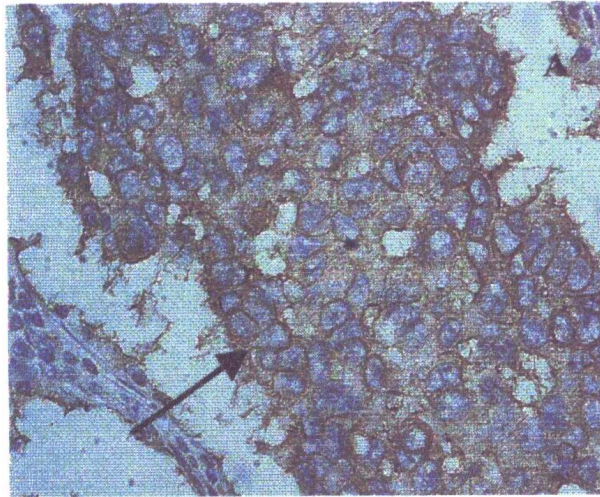
Mobley e Brueggemeier (2004) mostraram que há um mecanismo mediado pelo receptor de estrógeno (ER), o qual muda o perfil de algumas enzimas como SOD e GPx. Eles mostraram que 17 $\beta$ -estradiol induz mudanças no perfil antioxidante e que essas mudanças poderiam resultar de um mecanismo na qual há um aumento controlado de ERO, podendo potencializar o crescimento e a sensibilidade aos danos no DNA.

Alguns experimentos sugerem que o estrógeno tem um papel no desenvolvimento e crescimento do câncer de mama. Embora o exato mecanismo permaneça ainda para ser totalmente elucidado, a alquilação de moléculas celulares e a geração de radicais ativos que podem causar danos no DNA, associado ao potencial genotóxico do estrógeno e alguns de seus metabólitos (catecol) estão relacionados à função do estrógeno nos processos tumorais. A formação tumoral poderia ser resultado de uma excessiva estimulação hormonal, tendo evolução de um crescimento normal, para hiperplasia e por fim a neoplasia (Clemons e Goss, 2001). Alguns estudos têm correlacionado a expressão do ER com a quimiosensibilidade, porém muitas vezes os resultados são controversos (Kariya et. al., 2005). A participação de estrógeno e progesterona, através de seus receptores, no desenvolvimento dos tumores de mama é bem conhecida e estudada. Está claro que esses hormônios controlam a proliferação dos tecidos mamários. Sendo assim, uma superexpressão de seus receptores pode estar envolvida na sensibilização do epitélio da mama, resultando em efeitos proliferativos. Mais estudos sobre o mecanismo pelo qual esses hormônios controlam o desenvolvimento do tecido mamário normal e os tumores de mama poderiam levar à identificação de novos alvos para a prevenção do câncer de mama, para prever o risco de câncer de mama invasivo, bem como para determinar os tumores de mama em estágios iniciais (Anderson, 2002).

## 1.2. Biomarcadores tumorais

Além do receptor de progesterona (PR) e o ER, outras proteínas são utilizadas como biomarcadores tumorais, sendo muitas vezes um marcador para vários tumores ou simplesmente específico para um tipo de câncer. Ki-67 é uma proteína expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0, sendo utilizada para medir proliferação celular. O uso de Ki-67 como biomarcador é controverso. Aas e colaboradores (2003) mostraram que não houve correlação entre a expressão de Ki-67 e a resposta tumoral, enquanto que Petit e colaboradores (2004) sugeriram que esse gene poderia ser um bom marcador tecidual.

O gene HER-2/neu (c-erbB-2) codifica um receptor de transmembrana de tirosina quinase, e é um membro do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) ou da família HER. Essa família de receptores está envolvida na comunicação célula-célula e célula-estroma, através dos processos de transdução de sinais, os quais afetam a transcrição de vários genes pela fosforilação e desfosforilação de proteínas (Ross et. al., 2003). Os casos de câncer de mama que são positivos para HER-2 poderiam ser mais resistentes do que HER-2-negativo em baixas doses de quimioterapia baseada em antraciclina (Kariya et. al., 2005). A capacidade de um tumor de mama ser invasivo foi correlacionada com a expressão desse gene (Stark et. al., 2000). Atualmente, há somente dois marcadores moleculares que são usados para prognosticar a resposta ao tratamento em câncer de mama inicial e metastático: ER- $\alpha$  e HER2/neu (figura 1). Muitos outros marcadores têm sido usados para o prognóstico, mas nenhum deles tem reprodutibilidade suficiente para ser usado rotineiramente na prática clínica. O BRCA1, uma proteína envolvida na sinalização de danos no DNA, parece ser promissor como marcador de resposta clínica para tumores de mama e ovário (Mullan et. al., 2006). Considerando a importância da proteína p53 e seu grande envolvimento nos processos tumorais, esta proteína tem sido usada como biomarcador em cânceres. Pacientes p53-positivo poderiam se beneficiar de tratamentos com altas doses de quimioterapia, enquanto pacientes p53-negativo teriam benefícios em doses padrões de quimioterapia (Kroger et. al., 2006).



**Figura 1. Imunohistoquímica para proteína cerb-2.** Imunocoloração positiva para a proteína cerb-2 em carcinoma ductário de mama com membrana citoplasmática marcada em castanho (Agnoletto, 2004. Dados não publicado).

### 1.3. Sinalização Celular

Insultos endógenos e exógenos nas células, incluindo luz ultravioleta, radiação ionizante e estresse oxidativo, provenientes do metabolismo oxidativo, continuamente danificam o genoma celular (Motoyama e Naka, 2004; Lichtenstein, 2005). Esses danos podem causar erros durante o processo de replicação e mitose, tendo assim grandes contribuições para o desenvolvimento do câncer. Em decorrência disso, os organismos desenvolveram mecanismos de manutenção genômica, os quais incluem paradas de ciclo celular (*checkpoints*) em resposta aos danos no DNA. Os *checkpoints* fornecem o tempo para a célula reparar o dano no DNA antes que o ciclo progrida. Porém, se houver danos excessivos, gatilhos para apoptose podem ser ativados, assim como a senescência celular. Defeitos nos processos de *checkpoint* podem resultar em instabilidade genômica e levar à transformação de células normais em células tumorais. Mutações em vários genes que contribuem para os processos de parada de ciclo celular e reparo de danos no DNA são responsáveis por câncer hereditário, bem como por tumores esporádicos (Motoyama e Naka, 2004; Kastan e Bartek, 2004; Khanna e Chenevix-Trech, 2004; Dumitrescu e Cotarla, 2005; Malumbres e Barbacid, 2005).

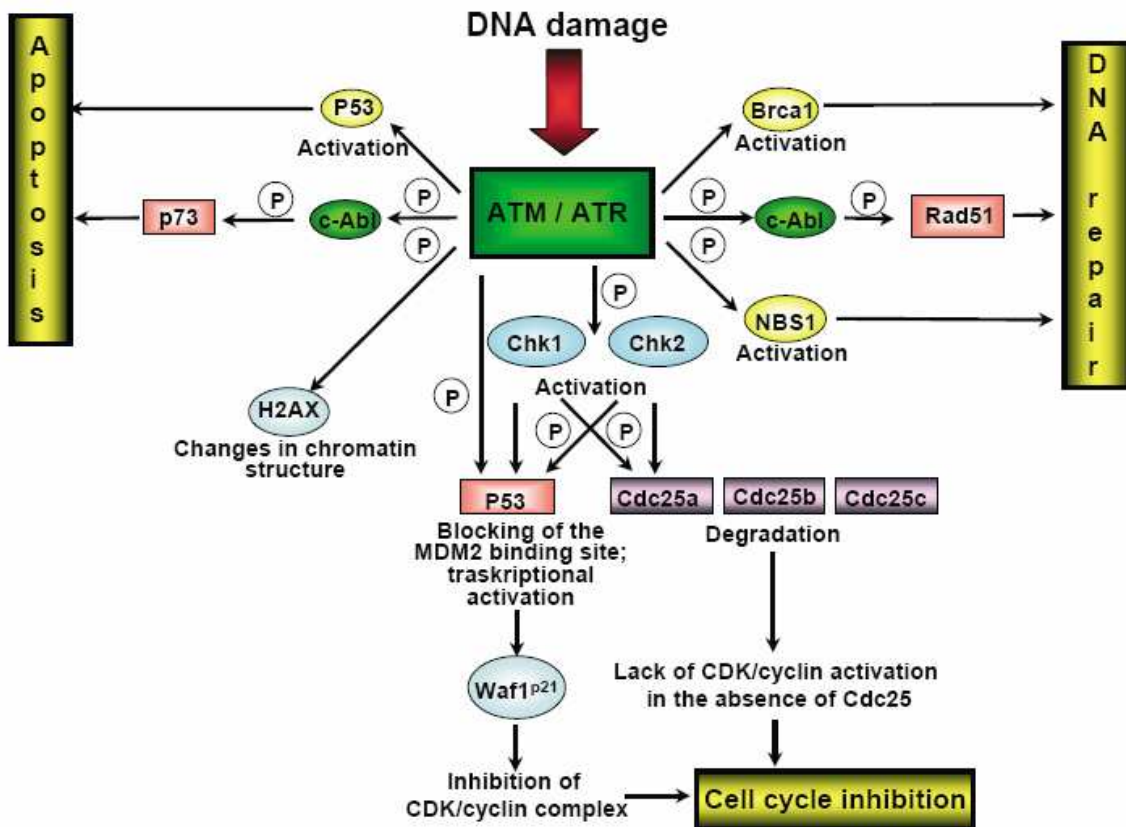
Agentes exógenos ou endógenos, como radiação ionizante e ERO, podem formar quebras de dupla fita de DNA (DSB). A resposta a esse tipo de dano requer o recrutamento da proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) e das ataxia telangiectasia relacionada Rad3 (ATR) (O'Driscoll e Jeggo, 2006). Ataxia telangiectasia é uma síndrome de instabilidade genética, caracterizada por progressiva degeneração neuronal, deficiência imunológica e aumento no risco de câncer, como o câncer de mama (suscetibilidade de 11% aos 50 anos, aumentando para 30% aos 70 anos) (Khanna e Chenevix-Trech, 2004; Dumitrescu e Cotarla, 2005). ATM e ATR são membros da família PI3K (fosfatidil-inositol-3-OH quinase) e proporcionam uma indução coordenada de eventos que levam à ativação de parada de ciclo celular, reparo de danos no DNA, transcrição de genes, e em alguns casos morte por apoptose (Khanna e Chenevix-Trech, 2004; Kastan e Bartek, 2004).

ATM e ATR são ativadas em resposta a DSB e estas estimulam a ativação, via fosforilação, de muitas outras proteínas como H2AX (uma histona variante), na serina 139 (nomeada de  $\gamma$ H2AX) e p53 (Vousden, 2002; Fernandez-Capetillo et. al., 2004; Vidanes et. al., 2005). A fosforilação de H2AX pode provir de danos externos, colisão da forquilha de replicação, apoptose e disfunção de telômeros. Muitas evidências

sugerem que  $\gamma$ H2AX é essencial para o recrutamento de proteínas de sinalização/reparo para o dano no DNA. Seu papel no reparo de danos no DNA não é totalmente conhecido, porém acredita-se que essa proteína possa aumentar os fatores de reparo perto do local da lesão e assim facilitar os mecanismos de reparo (Fernandez-Capetillo et. al., 2004).  $\gamma$ H2AX é usado como um marcador para DSB, produzidos por radiação ionizante e outras drogas que causem esse tipo de dano no DNA (Banáth and Olive, 2003), sendo considerada a histona guardiã do genoma (Fernandez-Capetillo et. al., 2004).

A ativação de p53 (via fosforilação) em decorrência a DSB requer não somente ATM, mas também outras proteínas como ATR, Chk1 e Chk2 (Vousden, 2002). Ambas as proteínas Chk1 e Chk2 são capazes de fosforilar p53 na serina 20, o que libera a p53 do seu principal inibidor, a proteína Mdm-2, a qual induz a decomposição de p53 via ubiquitinação (Christmann et. al., 2003). Em 1992, David Lane descreveu a p53 como “Guardiã do Genoma”, empregando essa proteína como supressora tumoral. Essa proteína participa dos três principais processos de manutenção celular: *checkpoint*, reparo de danos no DNA e apoptose. A ativação de p53 inibe rapidamente o crescimento celular por parada da proliferação ou pela indução da apoptose, impedindo dessa forma a propagação de células que poderiam sofrer transformação maligna. A p53 é altamente regulada, tanto nos seus processos de indução, quanto nos pós traducionais ou de destruição. Isso poderia explicar sua importância na manutenção da integridade genômica. (Vousden, 2002; Braithwaite et. al., 2005). Esse gene está mutado em aproximadamente 50% de todos os tipos de cânceres. Mutações em p53 de células germinativas foram identificadas em pacientes com a síndrome Li-Fraumeni, uma desordem autossômica dominante (Adimoolam e Ford, 2003; Dumitrescu e Cotarla, 2005). Sua estrutura é bem caracterizada e pode ser subdividida nos seguintes domínios: ativação transcripcional, seqüência específica de ligação ao DNA, reconhecimento de danos no DNA, interação proteína-proteína e o domínio regulatório C-terminal. O primeiro papel de p53 na supressão tumoral foi atribuído a sua função de fator transcripcional, regulando a expressão de vários genes celulares. Em resposta a uma variedade de estímulos genotóxicos, p53 também é ativada através de uma série de modificações pós-traducionais. Essa proteína regula o inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), a p21, sendo esta o primeiro mediador da parada de ciclo em G1, via p53 após danos no DNA (Stewart e Pietenpol, 2001; Adimoolam e Ford, 2003). A p53 é o centro de uma grande rede de sinalização, regulando muitos

desses processos, freqüentemente como um fator transcricional de genes *downstream*. Essa sinalização provém de um princípio muito básico: em resposta a uma grande variedade de estresses genotóxicos, as células são programadas para manter sua estabilidade genômica de um organismo a todo custo. A p53 está envolvida na sinalização de um dos principais mecanismos mantenedores da integridade genômica: o reparo de danos no DNA (Ford, 2005).



**Figura 2. Reconhecimento e sinalização de danos no DNA.** Nesse esquema está demonstrado o envolvimento de algumas proteínas nos processos de sinalização após o reconhecimento de danos no DNA. ATM e ATR possuem um papel fundamental no reconhecimento e posterior sinalização de danos no DNA. A proteína p53 é importante tanto para os processos de *checkpoint* do ciclo celular como na indução de apoptose. (Christmann et. al., 2003).

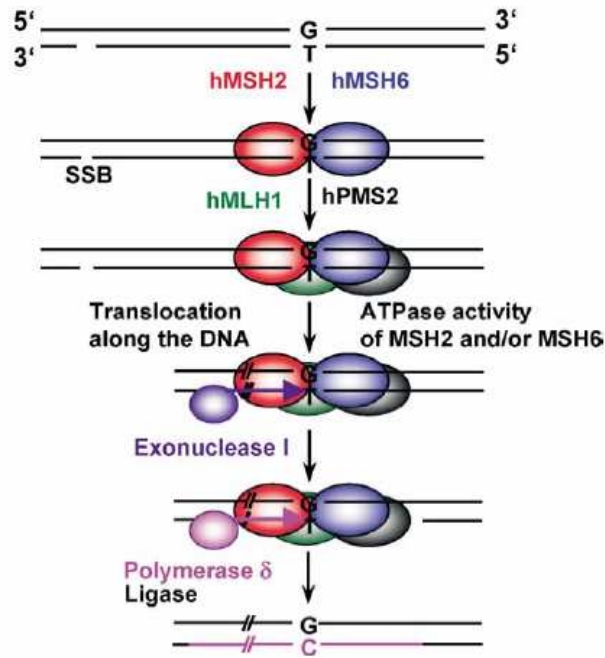
## 2. Mecanismos de reparo de danos no DNA

O reparo de danos no DNA constitui um dos mais estudados tópicos na biologia moderna. Os genes de reparo podem ser sub agrupados em: (1) genes associados com sinalização e regulação do reparo; (2) genes associados com distintos mecanismos de reparo, dentre eles o reparo por erro de emparelhamento (MMR); reparo por excisão de bases (BER); reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reversão direta dos danos no DNA, reparo recombinacional e síntese translesão (TLS) (Christmann et. al., 2003; Prakash et. al., 2005). Esses genes, quando mutados, podem estar correlacionados com o desenvolvimento tumoral, além de estarem vinculados com a resistência de células tumorais a drogas utilizadas no tratamento de cânceres (Christmann et. al., 2003). A lista de genes envolvidos nos mecanismos de reparo aumenta a cada ano. Um trabalho recente de revisão acrescentou 25 genes nessa lista, aumentando de 125 para 150, sendo que esses novos genes estão correlacionados aos vários processos de reparo (Wood et. al., 2005).

O reparo de danos direto envolve a proteína AlkB, a qual repara danos alquilantes como 1-metil-adenina e 3-metil-citosina em uma reação dependente de oxigênio, cetoglutarato e Fe (II), dispensando as DNA glicosilases ou metiltransferases (Christmann et. al., 2003).

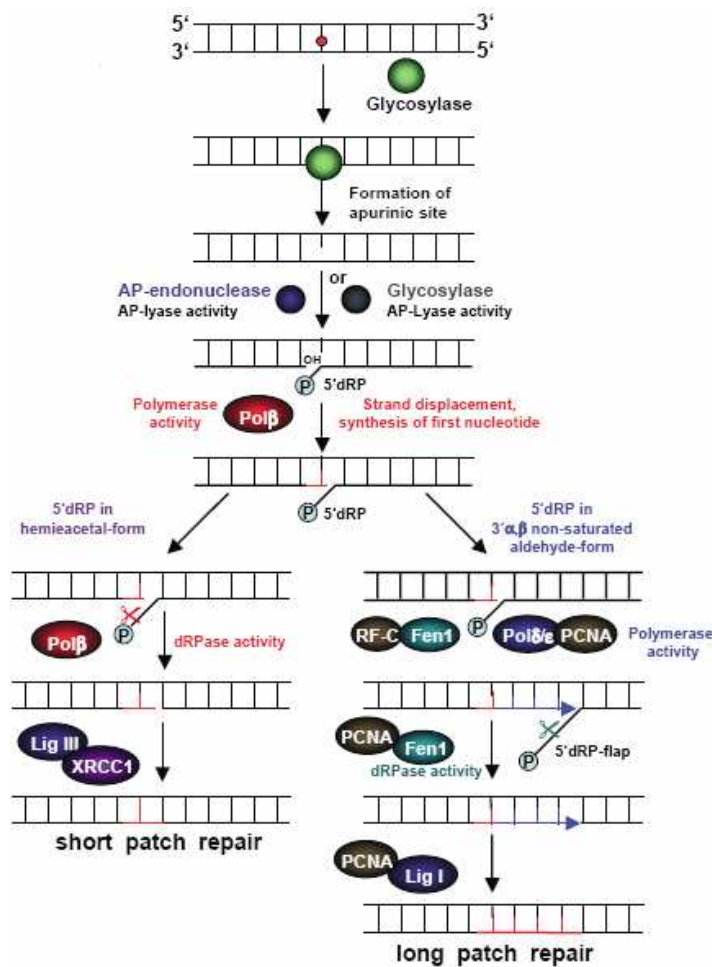
O sistema de MMR (Figura 3) é responsável pela remoção de danos causados por erros de pareamento entre as bases do DNA, causados de forma espontânea ou induzida (desaminação, oxidação, metilação e erros de replicação) (Christmann et. al., 2003). As principais etapas desse processo envolvem complexos protéicos como MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6), a qual reconhece a lesão, após ocorre a discriminação entre as fitas pela ausência das proteínas SSB (*single-strand breaks*) nas fitas filhas. Posteriormente ocorre a excisão da fita, envolvendo uma enzima com função exonucleásica, e por fim a síntese da nova fita, realizado pela DNA polimerase  $\delta$  (Christmann et. al., 2003).





**Figura 3. Reparo por erro de emparelhamento.** Nessa figura estão mostradas as principais proteínas envolvidas nesse processo de reparo (Christmann et al., 2003).

O BER é responsável pela remoção de bases do DNA danificadas, as quais podem ser reconhecidas por enzimas específicas, as DNA glicosilases. As principais lesões reparadas por BER são as bases oxidadas, as quais surgem espontaneamente dentro da célula, ou são provenientes de agentes exógenos, como radiação ionizante ou luz ultravioleta. Outras lesões que podem ser reconhecidas e reparadas por BER são as alquilações de DNA induzidas por agentes alquilantes ou por carcinógenos exógenos, como as nitrosaminas. Este processo de reparo possui os seguintes passos: reconhecimento da lesão, remoção da base e incisão da fita de DNA, distinção entre reparo *short- or long-patch*, após ocorre a inserção da base, e por fim o religamento das fitas (Christmann et. al., 2003) (Figura 4).



**Figura 4. Reparo por excisão de bases.** Esse esquema demonstra as principais proteínas, como as DNA glicosilases, bem como as duas sub-vias do BER (Christmann et al., 2003).

Adutos volumosos de DNA, como fotolesões (6-4 fotoprodutos) e dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), induzidos por luz ultravioleta, pontes intra e intercadeias (*crosslinks*), entre outros, são reparados pela via NER (Christmann et. al., 2003). De Silva et. al. (2000) mostraram o envolvimento de proteínas do NER no reparo de quebras de dupla fita. Esse sistema de reparo é um dos sistemas universais de reparação de danos no DNA pela sua capacidade de eliminar lesões que induzem deformações estruturais importantes no DNA. No homem, insuficiências neste processo vão originar diversas doenças hereditárias: *Xeroderma pigmentosum* (XP), Síndrome de Cockayne (CS) e Tricotiodistrofia (TTD) (revisado por Saffi e Henriques, 2003; Cleaver, 2005; Friedberg et. al., 2006) (Figura 5). XP é uma síndrome autossômica recessiva em que o paciente possui uma severa sensibilidade à luz solar, o que leva a uma progressiva degeneração nas regiões da pele e dos olhos expostas ao sol, levando a várias formas de

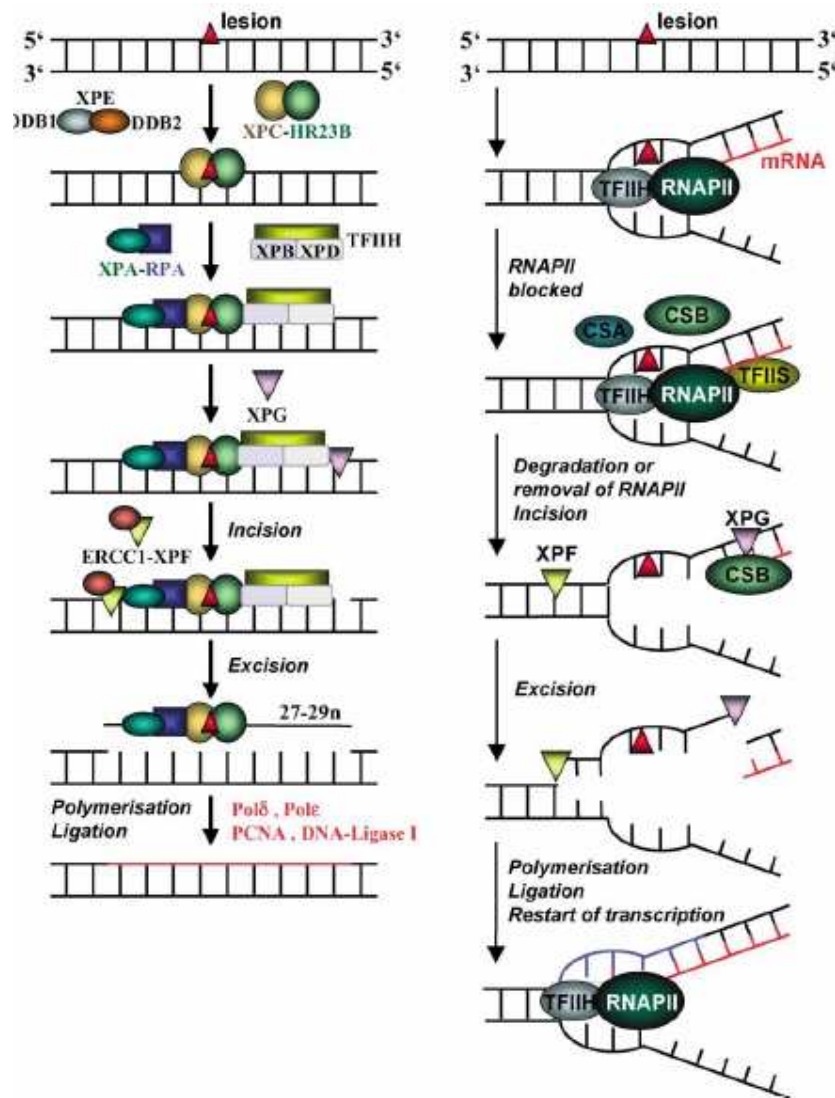
maligndade. Um número significativo de pacientes apresenta uma degeneração neurológica progressiva (Kraemer et. al., 1994; Lehamn, 2001). CS é caracterizada por fotosensibilidade cutânea, e possui uma aumentada sensibilidade à UV pela sua deficiência na via acoplada à transcrição (TCR). Esses pacientes possuem um retardo físico e mental (De Boer e Hoeijmakers, 2000). Embora muitos pacientes CS não têm qualquer característica clínica dos pacientes XP, há casos raros com a combinação de sintomas de XP com CS (XP/CS) (Lehamn, 2001). A TTD tem como principal característica a redução da matriz protéica rica em cisteína dos cabelos (*sulfur-deficient brittle hair*), além de retardo mental, icterícia da pele e redução da estatura. Muitos, mas não todos, os pacientes com TTD são sensíveis à luz solar, embora não tenham nenhuma mudança na pigmentação da pele e não há nenhuma referência de cânceres nesses pacientes (Lehamn, 2001; Bergmann and Egly, 2001).



**Figura 5. Pacientes com XP (a), TTD (b) e CS (c).** É notável a diferença de pigmentação entre os pacientes TTD e CS quando comparados com os pacientes XP. Adaptado de Lehamn (2001).

Diversos estudos bioquímicos e moleculares mostraram que o sistema NER pode ser subdividido em duas sub-vias de reparação: a reparação global do genoma (GGR) e a reparação acoplada à transcrição (TCR) (Figura 6). No homem, o reconhecimento da lesão é feito pelo complexo protéico XPC/hHR23B, no caso do GGR, e pelo bloqueio da RNA polimerase II, no caso do TCR (Hanawalt et. al., 2003; Costa et. al., 2003; Gillet e Schärer, 2006). Em seguida, é recrutado o complexo TFIIH. Das nove subunidades que fazem parte deste complexo, duas possuem função de helicases: XPB

(3'-5') e XPD (5'-3'). Para que ocorra a incisão em ambos os lados da lesão é necessário a atividade das endonucleases XPG e XPF/ERCC1.



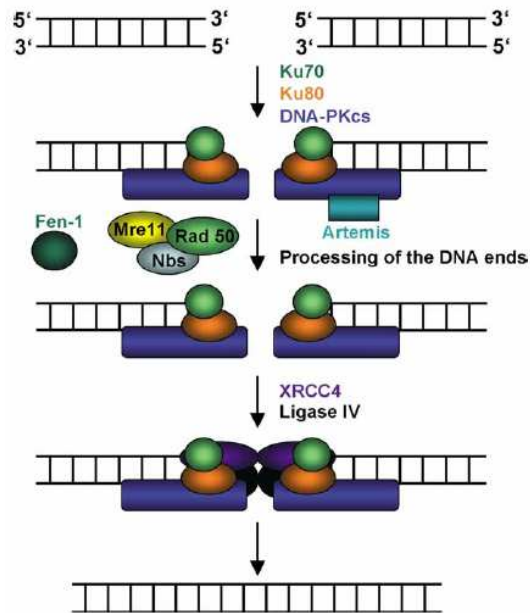
**Figura 6. Reparo por excisão de nucleotídeos.** Essa figura mostra a participação das proteínas XP nas duas vias do NER (reparação global do genoma e reparação acoplada à transcrição). É possível observar a proteína helicase XPD, acoplada ao fator transcricional TFIIH, atuando no processo de abertura das fitas. Apesar do processo de reconhecimento de danos no DNA ser distinto em ambas as vias, tanto GGR quanto TCR convergem para uma única via (Christmann et. al., 2003).

Os pacientes XP são deficientes na excisão de danos induzidos pelo UV ou por outros agentes genotóxicos, o que os torna hipersensíveis a estes agentes e resulta em forte predisposição ao câncer de pele (Costa et. al., 2003). Foi sugerida a existência de

interação física entre as proteínas BRCA1, BRCA2, XPD e XPB como tendo um papel na reparação de lesões oxidativas de fitas transcritas de DNA (Le Page et. al., 2000). A proteína XPD funcional é também necessária para a indução de apoptose dependente de p53 (Bernstein et. al., 2002). Seu domínio carboxi-terminal se liga com p53 *in vivo*, e esta ligação que envolve o complexo TFIIH, inibe a sua atividade de helicase (Seker et. al., 2001).

Embora as lesões no DNA causadas pela luz solar (UV) possam ser removidas pelos processos de NER e BER, muitas lesões escapam do reparo e apresentam um bloqueio no processo de alongamento transcricional, pela RNA polimerase e na replicação, pela DNA polimerase. Em eucariotos, as DNA polimerases, as quais pertencem a família Y, e DNA polimerase  $\zeta$  (zeta), membro da família B, promovem a replicação através da lesão. A polimerase eta (Pol  $\eta$ ), identificada primeiramente em leveduras, tem capacidade replicacional através de dímeros de *cis-syn* TT (timina-timina) pela inserção de duas adeninas em oposto ao dímero TT. Isso torna essa polimerase como uma das mais importantes em reparo de síntese translesão de CPD, uma vez que ela promove a replicação livre de erro (Prakash et. al., 2005).

As DSB são potentes indutores de efeitos genotóxicos (quebras cromossomais) e morte celular. Os dois principais mecanismos para o reparo de DSB são: recombinação homóloga (HR) e a recombinação não homóloga (NHEJ), as quais são livres de erro e suscetível de erro, respectivamente. Em eucariotos mais simples, a HR é o caminho predominante, enquanto que em mamíferos a NHEJ é a principal via de reparo de DSB. O uso de NHEJ e HR também depende da fase do ciclo celular. NHEJ ocorre predominantemente em G0/G1, enquanto que HR ocorre durante o final de S e G2. O sistema de reparo NHEJ liga duas pontas de DSB, sem o requerimento de seqüências homólogas entre as pontas do DNA. Esse processo envolve proteínas como Ku70 e Ku80 (as quais protegem o DNA da ação de exonucleases) e ainda a ação de DNA-PK (Christmann et. al., 2003) (Figura 7).



**Figura 7. Reparo por recombinação não homóloga.** Nesse esquema é observada a ação das proteínas do processo de NHEJ no reparo de uma DSB. Christmann et. al., 2003).

### 3. Apoptose

Para eliminar células que são redundantes, danificadas ou infectadas, os organismos vivos possuem mecanismos suicidas denominados de apoptose. Esse programa genético é vital para o normal desenvolvimento, para a manutenção da homeostasia celular, bem como para um sistema imune efetivo. Uma via de morte celular por apoptose envolve proteases, chamadas de caspases, as quais clivam várias centenas de substratos celulares. Dois principais caminhos de ativação de caspases foram descritos e reconhecidos: um envolve a ativação dos chamados “receptores da morte”, que estão localizados na superfície da célula (via extrínseca), e outro é provocado por várias formas de estresse, incluindo suporte de citocinas inadequado e diversos tipos de danos no DNA (via intrínseca). Essas vias apoptóticas podem envolver a mitocôndria, através da permeabilização de sua membrana, e conseqüentemente pela liberação de citocromo *c* e outras proteínas promotoras de morte celular. Ambos os caminhos da apoptose têm grupos independentes de caspases “iniciadoras”, e o caminho converge para a utilização do mesmo grupo de caspases “efetoras” que executam o final do programa de morte celular (Adams, 2003; Hajra e Liu, 2004). Alterações na expressão de genes envolvidos nesses processos, como Bcl-2 (proteína anti apoptótica), contribuem para a resistência de células tumorais à drogas. A superexpressão de proteínas da família Bcl-2, é proposto por ocorrer em mais da metade de todos os cânceres humanos, e múltiplas técnicas estão sendo usadas para diminuir essa expressão com objetivo de alterar o crescimento tumoral. Estudos de expressão em tumores primários e estudos mecanísticos em cultura de célula sugerem que a desregulação de caminhos intrínsecos da apoptose são importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer (Hajra e Liu, 2004).

#### 4. Doxorubicina

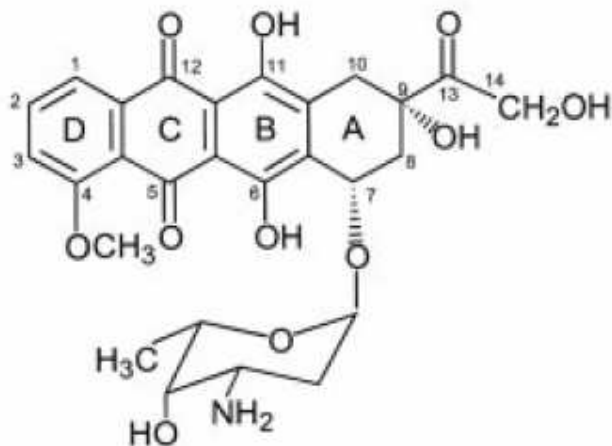
A doxorubicina (DOX) foi uma das primeiras antracilcinas isoladas, no decorrer da década de 60, a partir de *Streptomyces peucetius* (figura 8). A doxorubicina é um antibiótico antitumoral capaz de formar um complexo ternário com o DNA e com a topoisomerase II, induzindo a formação de quebras duplas no DNA, podendo levar a uma parada do ciclo celular (o que permite à célula recrutar as enzimas de reparo) ou a morte por apoptose (Minotti et. al., 2004). Lehmann e colaboradores (2003) mostraram que, em *Drosophila melanogaster*, os danos no DNA induzidos pela DOX são reparados preferencialmente pelo processo de recombinação homóloga.

A DOX é largamente utilizada na clínica, principalmente para o tratamento de câncer de mama (O'Shaughnessy, 2003), porém essa droga é utilizada em outros tratamentos como tumores sólidos na infância, alguns sarcomas, e linfomas agressivos (Minotti et. al., 2004). Apesar da sua atividade ser derivada principalmente da inibição da topoisomerase II e da dose utilizada ser determinante para seu mecanismo de ação (Gerwitz, 1999), outros efeitos podem também apresentar um papel importante em relação à sua atividade antitumoral. A formação de radicais livres, bem como a sua capacidade de alquilar diretamente o DNA ou de induzir a formação de pontes entre as duas cadeias de DNA, são importantes efeitos secundários ligados a esta classe de medicamentos (cardiotoxicidade), os quais limitam a sua utilização clínica (Minotti et. al., 2004).

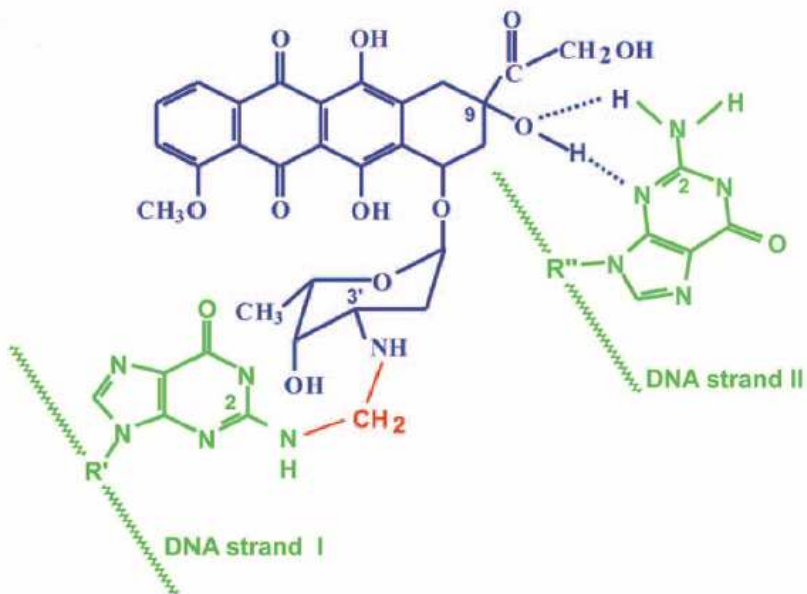
A formação de adutos de DNA pela DOX tem sido muito estudada, pois alguns pesquisadores têm comprovado a morte celular por efeito de adutos formados pela DOX (Swift et. al., 2006). Esses adutos são formados utilizando formaldeído para estabelecer uma ligação covalente entre uma das fitas de DNA e o açúcar da DOX, enquanto que a outra fita interage com a DOX através de pontes de hidrogênio (figura 9). O formaldeído é produzido dentro das células, sendo derivados de fontes de carbono, como lipídeos ou, no caso da DOX, ele pode prover da oxidação da própria droga. Interessantemente, elevados níveis de formaldeído foram detectados em células tumorais comparado com células normais, sugerindo que mais adutos poderiam ser formados em células tumorais, promovendo um nível adicional de toxicidade para essas células (Cutts et. al., 2005). Esta idéia é reforçada por vários estudos que mostram que a apoptose induzida por esta classe de medicamentos pode também ser em alguns casos,



independente da inibição da topoisomerase II e da indução da proteína p53 (Minotti et al., 2004).



**Figura 8. Estrutura química da doxorubicina.** Constituição básica de uma antraciclina, a qual possui os quatro anéis aromáticos (A, B, C e D), assim como um açúcar ligado a posição 7 do anel A. Adaptado de Minotti e colaboradores (2004).



**Figura 9. Estrutura química de um aduto de DNA formado pela DOX.** Essa figura mostra a ligação covalente da DOX com uma das fitas de DNA, a qual utiliza o carbono proveniente do formaldeído (vermelho), e as pontes de hidrogênio com a outra fita de DNA, as quais estabilizam a formação do aduto. (Cutts e colaboradores 2005).

## 5. Novas estratégias da Terapia Anti-Tumoral

Com o objetivo de tentar diminuir os efeitos colaterais das drogas antitumorais, sem diminuir o efeito citotóxico sobre as células tumorais, bem como ser o mais eficiente possível em relação aos alvos moleculares, a nanotecnologia tem ganhado espaço na terapia tumoral moderna. Nanomateriais, os quais medem 1-1000 nm, permitem uma interação com sistemas biológicos em nível molecular única. Eles podem também facilitar avanços importantes na detecção, diagnósticos, e tratamento de cânceres humanos. As técnicas baseadas em nanotecnologia podem ser aplicadas em diferentes doenças malignas. Alguns cânceres de mama expressam proteínas biomarcadoras (ex. receptor de hormônios) onde decisões terapêuticas são produzidas. Semicondutores de nanocristais fluorescentes têm sido conjugados a anticorpos, permitindo simultaneamente a marcação e quantificação dessas proteínas alvos em tumores de mama. Nanopartículas acopladas a alvos específicos podem ser usados para produzir a imagem do tumor e para detectar metástases periféricas. Várias nanotecnologias têm sido usadas para permitir a liberação de agentes quimioterápicos em células cancerígenas com o mínimo de toxicidade para os tecidos saudáveis, ao mesmo tempo em que se mantém a eficácia antitumoral. A Doxorubicina tem sido formulada com um sistema lipossomal de liberação, o qual mantém a eficácia da droga e diminui os efeitos cardíacos da droga (Yezhelyev et. al., 2006).

Além da nanotecnologia, outras formas de tentar minimizar os efeitos colaterais de tratamentos antitumorais têm sido investigadas. Pesquisadores têm voltado sua atenção para a utilização de tecnologias como a antisense, a qual utiliza o RNA de interferência (RNAi), assim como para alvos moleculares que são cruciais para a manutenção celular, como as proteínas de reparo de danos no DNA. A utilização do RNAi torna-se importante uma vez que esta tecnologia consegue destruir um alvo molecular (proteína) em sua raiz, ou seja, no RNAm (Madhusudan e Hickson, 2005; Dallas e Vlassov, 2006).

## II - OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Estudar as lesões e reparo de DNA, bem como perfil antioxidante de pacientes com câncer de mama, além de avaliar o papel do reparo por excisão de nucleotídeos no processamento de lesões induzidas pelo agente antitumoral doxorubicina (DOX) em fibroblastos humanos.

### 2. Objetivos Específicos

- Determinar os níveis endógenos de danos no DNA de linfócitos de sangue periférico de pacientes com câncer de mama, bem como a capacidade de reparo desses linfócitos a danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio, utilizando o ensaio cometa alcalino.
- Medir a atividade enzimática da SOD e CAT do plasma de pacientes com câncer de mama.
- Correlacionar os níveis endógenos de danos no DNA, bem como a capacidade de reparo aos danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio com a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.
- Determinar a sensibilidade de fibroblastos proficientes e deficientes no gene XPD (XPD, TTD e XP/CS) à DOX.
- Determinar o efeito da DOX no ciclo celular desses fibroblastos.
- Verificar o efeito de radicais livres liberados pela DOX no ciclo celular, bem como na morte celular induzida por esta droga.
- Medir os níveis de danos no DNA induzidos por DOX, bem como a capacidade de reparo dessas lesões, em fibroblastos proficientes e deficientes em XPD.
- Verificar a formação de quebras duplas no DNA, por marcação de *foci* de  $\gamma$ H2AX nas linhagens celulares proficientes e deficientes em XPD, na presença e na ausência de com DOX.

**III - CAPÍTULO I**

**DNA Damage and Antioxidant Status in Peripheral Blood Lymphocytes from  
Breast Cancer Patients**

**Artigo a ser submetido a Int. J. Cancer**

**DNA Damage and Antioxidant Status in Peripheral Blood Lymphocytes from Breast Cancer Patients**

*M. H. Agnoletto<sup>1</sup>, T. N. Guecheva<sup>1</sup>, F. Dondé<sup>1</sup>, A. F. de Oliveira<sup>2</sup>, F. Franke<sup>2</sup>, C. Cassini<sup>3</sup>, M. Salvador<sup>3</sup>, J. A. P. Henriques<sup>1,4</sup>, J. Saffi<sup>1,4\*</sup>*

<sup>1</sup>Biophysics Department – UFRGS – Porto Alegre - Brazil;

<sup>2</sup>Center of High Complexity in Oncology– CHCO – Ijuí - Brazil

<sup>3</sup>Center of Biothechnology – UCS – Caxias do Sul - Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Genetic Toxicology, Lutheran University of Brazil – ULBRA – Canoas, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Laboratory of Genetic Toxicology; Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas- RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774; jenifer.saffi@ulbranet.com.br

## **ABSTRACT**

Breast cancer is the most common malignancy among women and its rate of mortality is still high. In Brazil it is estimated that around 50,000 new cases of breast cancer will emerge in 2006. Impaired antioxidant status and/or DNA repair may elevate the risk of malignant transformation of breast cells due to the accumulation of spontaneous mutations in target genes and increasing susceptibility to exogenous carcinogens. In this study, blood samples were obtained from female patients with diagnosed breast cancer as well as from healthy individuals. In order to evaluate the role of DNA repair in breast cancer we determined the level of the lesions and the capacity to remove DNA damage induced by hydrogen peroxide in peripheral blood lymphocytes. For this purpose, the alkaline version of the comet assay, which provides a sensitive tool to investigate DNA damage and repair, was applied. The antioxidant status, measured by the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was estimated in blood plasma and no significant difference was observed between patients and controls. The level of endogenous DNA damage was higher in breast cancer patients compared to the control group and the patients did not repair these damages after 3 hours of incubation, in contrast with the control. Our results showed a direct relation between antioxidant status and endogenous DNA damage level, where the patients with high endogenous DNA damage levels presented lower SOD activity. These results suggest that DNA damage, as well as antioxidant status assays, seem to be useful molecular tools for monitoring ongoing exposures to DNA damaging agents. Such a research on the mutagen sensitivity and efficacy of DNA repair could impact on the development of new diagnostic and screening strategies.

**Key words:** breast cancer, DNA repair, Comet assay, anti-oxidant status.

## INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy among women and its rate of mortality is still high (Pecorelli et. al., 2003; Yabro, 2003; Strassmer-Weippt and Goss, 2003). It is estimated that in Brazil around 50,000 new cases of breast cancer will emerge in 2006 and in the Rio Grande do Sul state (south of Brazil), there are about 89 cases for each 100 000 women (INCA – Instituto Nacional do Câncer). About one-tenth of all breast cancer cases are characterized by a family history concerning this disease and among these, inherited mutations in the breast cancer susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2* are found in more than half (Lodish et. al., 2002; Trenz et. al., 2002; Blasiak et. al., 2004). Breast cancer development is associated with risk factors, which include reproductive events (such as menarche, menopause and pregnancy), exogenous hormones (such as oral contraceptive and hormone replacement therapy), lifestyle (alcohol, diet, obesity and physical activity), as well as genetics factors (high- and low-penetrance breast cancer susceptibility genes), among others (Dumitrescu and Cotarla, 2005).

Some risk factors associated with breast cancer may exert their effects via generation of reactive oxygen species (ROS), which are recognized to induce oxidative DNA damage and neoplastic transformation (Kumaraguruparan et al., 2005). Environmental agents such as ultraviolet light, ionizing radiation, chemical carcinogens and cigarette smoke can induce oxidative stress in organisms. Oxidative stress occurs when the production of ROS exceeds the body's natural antioxidant defense mechanisms, causing damage to macromolecules such as DNA, proteins and lipids (Bartsch and Nair, 2000). Therefore, ROS are also being increasingly implicated in breast cancer development (Sipe et. al., 1994; Le Page et. al., 2000).

The response of the cells to DNA damage and its ability to maintain genomic stability by DNA repair determine cellular susceptibility to endo- and exogenous factors, including carcinogens (Bernstein et. al., 2002; Sarasin, 2003; Christmann, 2003). Moreover, increased efficiency of DNA repair or lack of apoptosis induction may play a role in the resistance of cancer cells to therapeutic drugs, since most of them, like doxorubicin, cause DNA damage due to direct interaction with DNA or free radical release (Bonassa, 1998; Moustacchi, 2000; Blasiak et. al., 2004; Minotti, et. al., 2004). Increased nucleotide repair activity was observed in tumor tissues of patients that were resistant to cisplatin-based chemotherapy (Yu et. al., 1996; Metzger et. al., 1998; Li et.

al., 2000). On the other hand, defects in mismatch repair proteins have been associated with clispatin and doxorubicin resistance in human tumor cell lines (Fink et. al., 1996; Vaisman et. al., 1998; Fedier et. al., 2001).

The sensitivity of the cell to ROS is attenuated by an array of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) that catalyze the detoxification of superoxide anion and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), respectively, protect the cell against ROS-induced damage. Reduced glutathione (GSH) in conjunction with glutathione peroxidase (GPx) plays a central role in the defense against free radicals, peroxides, and a wide range of xenobiotics and carcinogens (Kumaraguruparan et. al., 2005; Tas et. al., 2005).

Identification of endogenous sources for DNA damage and the resulting oxidative modification of cellular components will give new insights into the disease process as well as will provide a better basis for chemoprevention. Increased oxidative stress and lipid peroxidation (LPO) causing DNA damage, together with disturbance of cell signaling pathways, have been implicated in several human cancers (Bartsch and Nair, 2000).

The expression of some genes in the tumor process can be related with chemotherapy resistance, poor or good prognostic, kind of treatment, among other diagnostic factors. Both estrogens and androgens play critical roles in the development of breast cancer, which has been confirmed by numerous epidemiologic data on the levels of serum and urine hormones in populations at low and high risk, as well as by case-control and cohort studies (Sipe et. al., 1994; Liang et. al., 1998; Starek, 2003; Ma et. al., 2006). Estrogen carcinogenesis is attributed to receptor-mediated growth and proliferation of breast epithelial cells and to DNA impairment caused by activated estrogen metabolites, e.g., catechol estrogens and free radicals (Starek, 2003). Cell proliferation activity is investigated for its association with tumor progression and, in this case, Ki-67 has been identified as a good marker, because it can define the worse outcome prognosis and the treatment of the breast cancer patients (Daidone and Silvestrini, 2001). Overexpression of Her-2/*neu* gene has been identified in benign breast cancer disease biopsies and associated with a greater risk of subsequent invasive breast cancer (Stark et. al., 2000). Furthermore, this gene is related to breast cancer treatment (Ross et. al., 2003). The functional p53 protein plays also a crucial role in the maintenance of genomic integrity because of its involvement in checkpoint and DNA repair signaling, as well as in apoptosis induction. Therefore, its expression is much



important in cancer development and therapy (Vousden, 2002; Braithwaite et. al., 2005; Kroger et. al., 2006).

The present study was therefore designed to evaluate the relationship between antioxidant status in blood plasma and DNA damage in peripheral lymphocytes of breast cancer patients. To evaluate the extent of DNA damage and the sensitivity to exogenous mutagens in breast cancer therapy we determined the level of basal DNA damage, and the capacity to remove DNA damage induced by hydrogen peroxide in the peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients and healthy individuals. DNA damage and repair were evaluated by alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay).

## MATERIALS AND METHODS

### **Blood samples:**

Heparinized blood samples were obtained from 25 female breast cancer patients, with mean age of  $54.8 \pm 9.7$  years, treated at the 'Center of High Complexity in Oncology', Ijuí, RS, Brazil and 19 healthy women with mean age of  $45.4 \pm 8.3$  years (control). The blood samples were taken before the chemotherapy or after some cycles of chemotherapy (21-to-21 days), which was composed of three drugs, 5-fluorouracil, adriamycin and cyclophosphamide (FAC protocol). The study was approved by the University Human Subjects Committee of UFRGS. Each subject completed a personal health questionnaire, covering information of age, smoking, drinking, and exposure to radiation, hormone therapy, menarche and medicinal drugs. All participants signed informed consent documents before the interview.

### **DNA damage evaluation by Comet assay:**

Peripheral blood lymphocytes were isolated by density centrifugation (30 min,  $18^{\circ}\text{C}$ ,  $400 \times g$ ) on Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus. To examine basal DNA damage, aliquots (20 $\mu\text{l}$ ) of the lymphocytes were taken immediately after centrifugation, mixed with (80 $\mu\text{l}$ )

0.75% low melting point agarose and cast onto microscope slides precoated with 0.5% normal melting agarose.

To examine endogenous DNA damage and DNA damage repair, after centrifugation (30 min, 18°C, 400 X g) the cells were separated into 3 tubes: 1) for evaluation of basal damage, 2) for treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10μM, 5 minutes on ice), and 3) for treatment with MMS (8 x 10<sup>-5</sup>M, 1 hour at 37 °C), as positive control.

After the treatments, the cells were washed with PBS (centrifugation, 5 min, 4°C, 200 X g) and incubated in RPMI 1640 (200μl) with 10% fetal calf serum. Aliquots of the suspension (20μl) were taken immediately, and also 60 or 180 minutes of post incubation, mixed with (80μl) 0.75% low melting point agarose and cast onto microscope slides precoated with 0.5% normal melting agarose.

The comet assay was performed under alkaline conditions essentially according to the procedure of Singh et al (1988). Comet assay is a rapid, simple and sensitive technique for measuring and analyzing DNA breaks and repair in single cells (Tice, 1995; Fairbairn et. al., 1995; Alapetite et. al., 1996; Leprat et. al., 1998 Tice et. al., 2000). This assay has been also used in various studies to investigate the effect of ROS on DNA (Collins et al., 1995; Collins and Harrington, 2002; Liu et al., 2003). Briefly, after lysis DNA was allowed to unwind for 30 min in electrophoresis solution consisting of 300mM NaOH, 1mM EDTA (pH>13). Electrophoresis was conducted at 4°C for 30 min at electric field strength 0.94 V/cm. The slides were then neutralized with 0.4M Tris, pH 7.5, and revealed by silver staining. One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4). The damage score positively correlated with the level of DNA breaks or/and alkali-labile sites in the cell. In the DNA repair study, the difference between the basal level of DNA damage (at the start of incubation) and the damage extension after different periods of incubation (60 or 180 minutes) was taken as an index of the efficacy of DNA repair.

#### **Antioxidant status:**

Serum SOD activity was determined spectrophotometrically at 480 nm by measuring inhibition of the rate of auto catalytic adrenochrome formation, one superoxide dismutase unit being defined as the amount of enzyme inhibiting the rate

of adrenochrome formation by 50% per gram of protein (Mirsa and Fridovich, 1972). Catalase activity was assayed by the method of Chance and Machley (1954), one unit of catalase decomposing 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide per mg of protein per minute at pH 7.4. Total protein was determined spectrophotometrically at 545 nm by the Biuret method (Labtest Total Protein Kit, catalogue # 18).

### **Statistical analysis:**

Differences between mean values were tested for significance ( $P < 0.05$ ) using Student's t-test.

## RESULTS

### **Risk factors**

Considering epidemiological studies conducted in different populations that point out some reproductive events (such as menarche and menopause), exogenous hormones (such as oral contraceptive) and genetics factors, among others, as risk factors (Dumitrescu and Cotarla, 2005), we analyzed the data obtained by a questionnaire that cover some factors cited above, which was filled out by breast cancer patients and healthy individuals.

The mean age of menarche among patients was  $13.2 \pm 1.1$  and the healthy women were  $12.8 \pm 1.3$ . In this work 43% of the healthy women and 28% of the women with cancer have used the oral contraceptive method in the last seven years.

Another important risk factor in breast cancer development is the exposure to harmful environmental agents. In this study, 36% of the women with cancer worked in agriculture and reported exposure to UV and other carcinogenic agents, such as pesticides, that could be related to cancer induction. Besides, 83% of the exposed women with breast cancer reported absence of care with individual protection to these harmful agents in the last 10 years. On the other hand, only 15% of the healthy

individuals were exposed to these risk factors, and all of them informed to take care with the protection.

### **DNA damage and repair efficacy**

DNA damage repair is an important process in genome integrity maintenance. Oxidative DNA damages and DSB induced by free radicals exposure have a great role in genetic instability and, consequently, in the tumoral process (Bernstein et. al., 2002; Hussain et. al., 2003). In this work, we measured the basal DNA damage, the DNA damage induced by hydrogen peroxide (10 $\mu$ M) and MMS (8 x 10<sup>-5</sup>M), as well as the repair capacity in peripheral lymphocytes from breast cancer women and healthy individuals by using the alkaline comet assay.

Figure 1 demonstrates the basal and induced DNA damage in peripheral lymphocytes of healthy and breast cancer individuals. It is seen that breast cancer patients show a significant level of endogenous DNA damage when compared to healthy individuals (figure 1A). Interestingly, healthy individuals presented higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage than patients, while MMS-induced lesions were significant in both healthy and patients group. We did not observe significant difference between endogenous DNA damage of patients that did not receive chemotherapy and the patients that have received some cycles of chemotherapy (figure 1B). Therefore, the results presented in figures 1 (A and B) include both types of patients.

The repair capacity, measured by alkaline comet assay after 1 or 3 hours of post-incubation with either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is shown in figures 2 (A and B, respectively). The blood lymphocytes of the patients had a different repair efficacy to either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or MMS-induced lesions, when comparing to controls. After 3 hours, there was a clear reduction in the comet assay tails of control individuals lymphocytes, while for the patients group the damage score remained almost the same (even higher than time zero for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment) (figure 2).

### **Antioxidant status**

Figure 3 (A and B) shows the antioxidant parameters, as SOD and CAT, respectively, of both healthy individuals and breast cancer patients. The patients had

lower SOD (figure 3A) and CAT (figure 3B) activities than healthy women, although these differences were not significant.

### **Endogenous DNA damage vs. Antioxidant status**

Figure 4 (A, B and C) shows the correlation between endogenous DNA damage and the antioxidant parameters of patients with breast cancer. We separated the patients with high DNA damage levels and the patients with low DNA damage levels. Figure 4A shows that the patients with low endogenous DNA damages have their damage levels similar to the control group; in contrast, the group of patients with high damage levels has a great difference to control. Our results show a relation between endogenous DNA damage and SOD activity, where the group of patients that have high DNA damage levels presented lower SOD activity than the group with low DNA damage levels (figure 4B). Interestingly, this relation did not occur when we related the DNA damage with CAT activity (figure 4C).

### **Biomarkers**

Table 1 shows the immunohistochemistry results of some biomarkers, as ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), c-erbB2, p53 and Ki-67. It is important to remark that all these data were obtained from the 'Center of High Complexity in Oncology', Ijuí, RS, Brazil. They are part of standard procedures for diagnosis and further treatment. All women with cancer presented positively to ER staining, among them 50% had moderate-high expression. PR receptor was not expressed in 27.3% of the patients and 36.3% presented moderate-high expression to this protein (table 1).

C-erbB-2 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor protein, which is involved in many signalization processes (Ross et. al., 2003). In this work, 22.8% of the patients presented negative staining for this protein, while 77.2% were positive. Among these, 45.4% had moderate-high expression (table 1).

p53 protein is involved in many signaling pathways that regulate cell cycle progression, DNA damage repair and apoptosis induction (Vousden, 2002). Our results

showed that 72.7% of the patients are positive for p53, indicating more than 5% tumor cells are positive; however, it is important to consider that this assay does not identify if the protein is functional (table 1).

Ki-67 is a protein involved in cellular proliferation and is correlated with poor outcome prognosis (Urruticoechea et. al., 2005; Dowsett, et al., 2006). In our study, all patients with breast cancer presented positive staining for Ki-67 protein (table 1).

## DISCUSSION

Reproductive events, exogenous hormones and lifestyle are some risk factors involved in breast cancer predisposition. Menarche age (less than 12 years of age versus more than 14 years of age) has been associated with increase in breast cancer risk of about 10-20%, probably because of the prolonged exposure of breast cancer epithelium to estrogens and progesterone (Dumitrescu and Cotarla, 2005). In this work, these risk factor was not correlated with the cancer development, because the menarche medium age of the patients is similar to that of healthy individuals.

Susceptibility to cancer is characterized by high DNA damage, which is the result of low repair capacity (Bernstein et. al., 2002; Sarasin, 2003). Excessive estrogen exposure, that provides proliferative stimulus by 17 beta-estradiol leads to the appearance of spontaneous mutations and is associated with breast cancer risk. Moreover, 17 beta estradiol acts as genotoxic agent by complementary pathways inducing direct (estrogen-quinone DNA adducts) and indirect (via redox cycling) DNA damage (Okobia and Bunker, 2003). Some other risk factors associated with breast cancer may also cause generation of ROS, which are recognized to induce oxidative DNA damage and neoplastic transformation (Kumaraguruparan et. al., 2005).

In this work, the breast cancer patients had a lower susceptibility to DNA damage induced by hydrogen peroxide in relation to the control group, but the induced DNA damage is not repaired in 3 hours period in contrast to the control group (Fig. 2A). The alkylating agent (MMS) caused significantly elevated DNA damage in lymphocytes from breast cancer patients and healthy controls, which are repaired after 3 hours of post-incubation in the control group. Blasiak et al., 2004, have reported lower repair capacity in lymphocytes of breast cancer patients but in their study the patients were more sensitive towards hydrogen peroxide induced DNA damage. The alteration

of repair efficiency is reported also in lung cancer (Schmezer et. al., 2001, Rejaee-Behbahani et. al., 2001), head and neck cancers (Sturgi and Wie, 2002), among others (Berwick and Vineis, 2000). This delay and/or lack of repair could explain the higher basal DNA damage in breast cancer patients in relation to the control group in our study and can lead to increased susceptibility towards exogenous carcinogens. Accumulation of spontaneous mutations in target genes as a result of impaired DNA repair could be correlated with high risk of cancer development (Ames, 1998; Das, 2002; Aas et. al., 2003).

Our results showed that the patients with breast cancer have lower SOD and CAT activity than controls, although the differences do not reach significance. Inhibition of SOD and CAT activity was reported also in stomach cancer (Batcioglu et. al., 2006), oral squamous cell carcinoma (Manoharan et. al., 2005), cervical cancer (Beevi et. al., 2006) and prostate cancer (Aydin et. al., 2006). On the other hand, Yeh et. al. (2005) showed that there is an increase in SOD and GPx activities in patients with breast cancer. As can be seen, the results about antioxidant status in cancer patients are contradictory, so further investigation could permit to clarify if the altered antioxidant status is a reason or it is caused by the development of the disease itself.

In this work we showed that lymphocytes from breast cancer patients with high levels of DNA damage have a lower SOD activity in opposite to patients with low levels of DNA damage, which resemble the activity controls (Fig. 4). These results suggest that some patients with breast cancer accumulate endogenous DNA damage caused by agents like free radicals, in lymphocytes of peripheral blood, which could indicate physiological alterations in these patients. The elevated frequency of individuals with reduced repair capacity among cancer patients and their relatives is evidence that repair capacity of oxidative DNA damage is genetically determined (Gackowski et. al., 2005).

In breast cancer, most of the tissue markers investigated in recent decades are related to cell proliferation, apoptosis, hormonal dependence, neo-angiogenesis, invasion and metastasis, and have been associated with disease progression and patient outcome (Daidone et. al., 2004). Mobley and Brueggemeier (2004) have shown that estrogen receptor can regulate the oxidative stress in culture of breast cancer cell lines, since all patients that presented positive staining for the estrogen receptor had also high levels of SOD and CAT activities. In our study, however, we did not observe a direct correlation between the antioxidant status and ER.

The use of biomarkers is important in order to increase the knowledge and try to reduce the intrinsic clinical complexity of the tumor treatment. It is very important to accurately assess the individual patient risk profile at the initial diagnosis and to identify the optimal local-regional and systemic treatment modalities (Daidone et. al., 2004). Patients whose tumoral p53-positive staining present might benefit more from high-dose chemotherapy than from standard chemotherapy, and p53-negative patients might benefit more from standard chemotherapy than from high-dose therapy (Kroger et. al. 2006). High Ki-67 is a sign of poor prognosis associated with a good chance of clinical response to chemotherapy, which can potentially be cured using local-regional treatment alone (Daidone et. al., 2004; Urruticoechea et. al., 2005; Dowsett et. al., 2006).

Our work emphasizes the utility of Comet assay for DNA damage evaluation in lymphocytes from breast cancer patients as an auxiliary technique for therapy decision making, once we showed a relation between two factors, i.e., DNA damage and antioxidant status, directly involved in cancer development. We believe that studies in this direction are of fundamental importance, because antioxidant status and capacity of DNA damage repair are important to maintain genomic fidelity and integrity, and also, could indicate possible resistance to chemotherapy.

## REFERENCES

- Aas T, Geisler S, Eide GE, Haugen DF, Varhaug JE, Bassoe AM, Thorsen T, Berntsen H, Borresen-Dale AL, Akslen LA, Lonning PE (2003). Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*, 39: 438–446
- Alapetite C, Wachter T, Sage E, Moustacchi E (1996). Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and  $\gamma$ -rays. *Int J Radiat Biol* 69:359-369
- Aydin A, Arsova-Sarafinovska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O, Erten K, Ozgok Y, Dimovski A (2006). Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem* 39:176-9



- Bartsch H, Nair J (2000). Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: Markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology* 153:105–114
- Batcioglu K, Mehmet N, Ozturk IC, Yilmaz M, Aydogdu N, Erguvan R, Uyumlu B, Genc M, Karagozler AA (2006). Lipid peroxidation and antioxidant status in stomach cancer. *Cancer Invest* 24:18-21
- Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A (2006). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta* [Epub ahead of print]
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research* 511:145-178
- Berwick M, Vineis P (2000). RESPONSE re: markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 92:1537
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zadrozny M (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res* 554:39-148
- Bonassa E (1998). *Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Atheneu Ed. ISBN 85:7379-047-4
- Braithwaite AW, Royds JA and Jackson P (2005) The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 26:1161-1169
- Chance B & Maehly AC (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzimol* 1:357-424
- Christmann M, Tomicic MT, Ross WP, Kaina B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34
- Collins AR, MA A, Duthie SJ (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336:69-77
- Collins AR, Harrington V (2002). Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 17:489-93
- Daidone MG, Silvestrini R (2001). Prognostic and predictive role of proliferation indices in adjuvant therapy of breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30:2735

- Daidone MG, Paradiso, A, Gion M, Harbeck N, Sweep F, Schmitt M (2004). Biomolecular features of clinical relevance in breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 31:3-14
- Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I, Salter J, Detre S, Hills M, Ashley S, Francis S, Walsh G, A'Hern R (2006). Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res* 12:1024s-1030s
- Dumitrescu RG, Cotarla I (2005). Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 9:208-221
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339:37-59
- Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D (2001). Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 93:571-6
- Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R (2005). Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer* 114-153-6
- Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC (2003). Radical causes of cancer. *Nature* 3:276-284
- Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, Loning T (2006). Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:159-68
- Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy J, Naginia R (2005). Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clinical Biochemistry* 38:54-158
- Le Page F, Voahangy R, Didier M, Jeannine C, Michel P, Jean F, Sarasin A (2000). BRCA1 and BRCA2 Are Necessary for the Transcription-Coupled Repair of the Oxidative 8-Oxoguanine Lesion in Human Cells. *Cancer Research* 60:5548–5552
- Leprat F, Alapetite C, Rosselli F, Ridet A, Schlumberger M, Sarasin A, Soares HG, Moustacchi E (1998). Impaired DNA repair as assessed by the 'Comet' assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 40:1019-1026
- Li WS, Wei SC, Liang SZ (2000). [The use of two-route Cisplatin chemotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 9:76-8.

- Liang X, Lu B, Scott GK, Chang CH, Baldwin MA and Benz CC (1998). Oxidant stress impaired DNA-binding of estrogen receptor from human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 146:151–161
- Liu X, Zhao J, Zheng R (2003). DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutation Research* 539:1-8
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2002). *Biologia Celular e Molecular* 4ed., REVINTER, Rio de Janeiro, p. 1076-1078
- Ma H, Bernstein L, Ross RK and Ursin G (2006). Hormone-related risk factors for breast cancer in women under age 50 years by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and case-case comparison. *Breast Cancer Research* 8:1-10
- Manoharan S, Kolanjiappan K, Suresh K, Panjamurthy K (2005). Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 122:529-34
- Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Konda B, Leichman L (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 16:309-16
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumoral Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56:185-229
- Mirsa HP & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175
- Mobley JA and Brueggemeier W (2004). Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25:3-9
- Moustacchi E (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation Research* 464:35-40
- Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, Odicino F (2003). Cancer in Women. *Int J Gynaecol Obstet* 82:369-79
- Rajae-Bebahani N, Schmezer P, Risch A, Rittgen W, Kayser KW, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Thiel S, Bartsch H (2001). Altered DNA repair capacity and

- bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 95:86-91
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puzstai L, Bloom KJ (2003). The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 8:307-325
- Sarasin A (2003). An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation. Research.* 544:99-106
- Schmezer P, Rajae-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H (2001). Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 16:25-30
- Singh NP, McCoy T, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–192
- Sipe HJJ, Jordan SJ, Hanna PM and Mason RP (1994). The metabolism of 17 $\beta$ -estradiol by lactoperoxidase: a possible source of oxidative stress in breast cancer. *Carcinogenesis (Lond.)* 15:2637–2643
- Starek A (2003). Estrogens and organochlorine xenoestrogens and breast cancer risk. *Int J Occup Med Environ Health* 16:113-24
- Strassmer-Weippl K, Goss PE (2003). Prevention of breast cancer using SERMs and aromatase inhibitors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:5-18
- Sturgis EM, Wei Q (2002). Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 14:310-7
- Tas F, Hansel H, Belce A, Ilvan S, Argon A, Camlica H and Topuz E (2005). Oxidative stress in breast cancer. *Medical Oncology* 22:11-15
- Tice RR (1995). Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth FM (ed): "Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change." New York: Plenum Press 314-327
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-21
- Trenz K, Rothfuss A, Schütz P, Speit G (2002). Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutation Research* 500:89-96

- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M (2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 23:7212-80
- Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 58:3579-85
- Vousden KH (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1602:47-59
- Yabro CH (2003). International nursing and breast cancer. *Breast J* 2:S98-S100
- Yeh C, Hou M, Tsai S, Lin S, Hsiao J, Huang J, Wang L, Wu S, Hou L, Ma H, Tsai L (2005). Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 361:104-111

## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1. DNA damage in peripheral lymphocytes.** The basal DNA damage and the DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10μM, 5 minutes, 0 °C) and MMS (8 x 10<sup>-5</sup>M, 1 hour, 37 °C) were measured in peripheral lymphocytes of breast cancer patients by alkaline comet assay (A). The graphic B shows the endogenous DNA damage of patients before of the chemotherapy (white bars) and after some cycles of chemotherapy (black bars). One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4).

\*P<0.05 \*\*\*P<0.001

**Figure 2. Repair Efficacy to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MMS induced lesions.** After the treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MMS (as described in figure 1) the lymphocytes were incubated with RMPI medium (supplemented with 10% fetal calf serum) for 1 or 3 hours at 37 °C. One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4).

**Figure 3. Antioxidant status.** Serum SOD and CAT activities, were measured in the plasma of breast cancer patients and of healthy individuals. SOD activity was determined spectrophotometrically at 480nm by measuring inhibition of the auto catalytic adrenochrome formation rate (A). Catalase activity was determined spectrophotometrically at 545 nm by hydrogen peroxide decomposing (B).

\*\*P<0.01

**Figure 4. Correlation between DNA damage and antioxidant status.** The results obtained with comet and antioxidant enzymes (SOD and CAT) were correlated with DNA damage score and are shown in this figure. (I)- DNA damage levels of controls. (II)- Patients that presented DNA damage score below 100 and (III)- patients with DNA damage score above 100 (A). The antioxidant enzymes SOD and CAT are correlated with DNA damage score in panels B and C, respectively. These panels also show (in the smallest graphs) the distribution of patients within each group.

\*P<0.05 \*\*\*P<0.001

Figure 1A

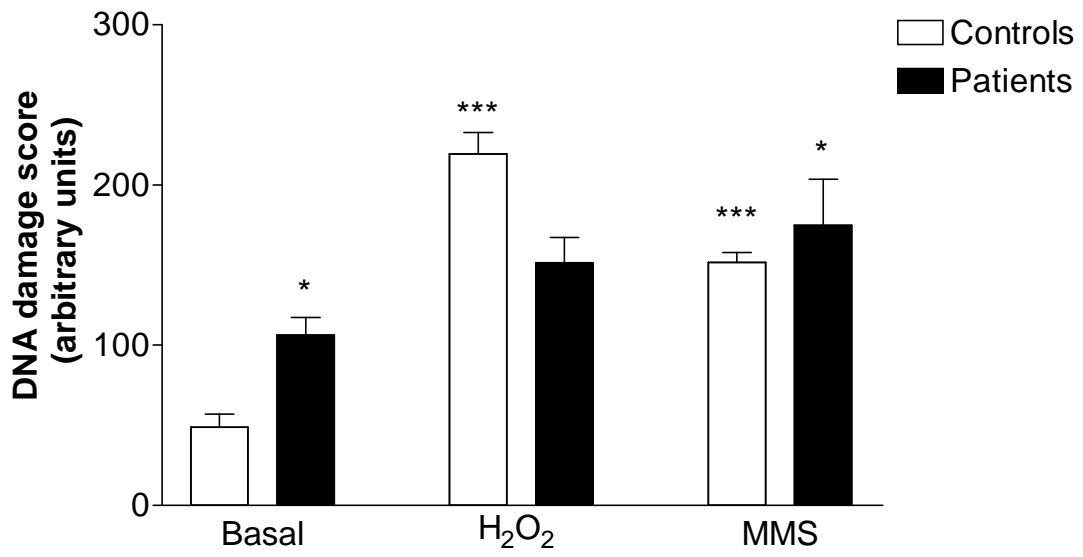


Figure 1B

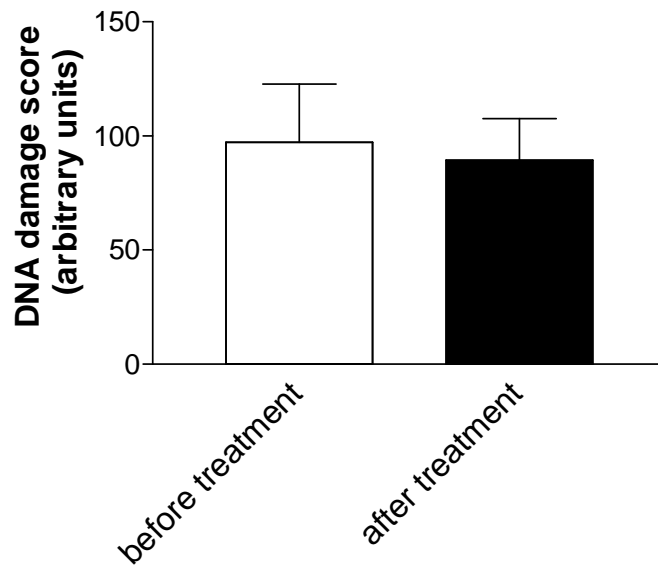


Figure 2A

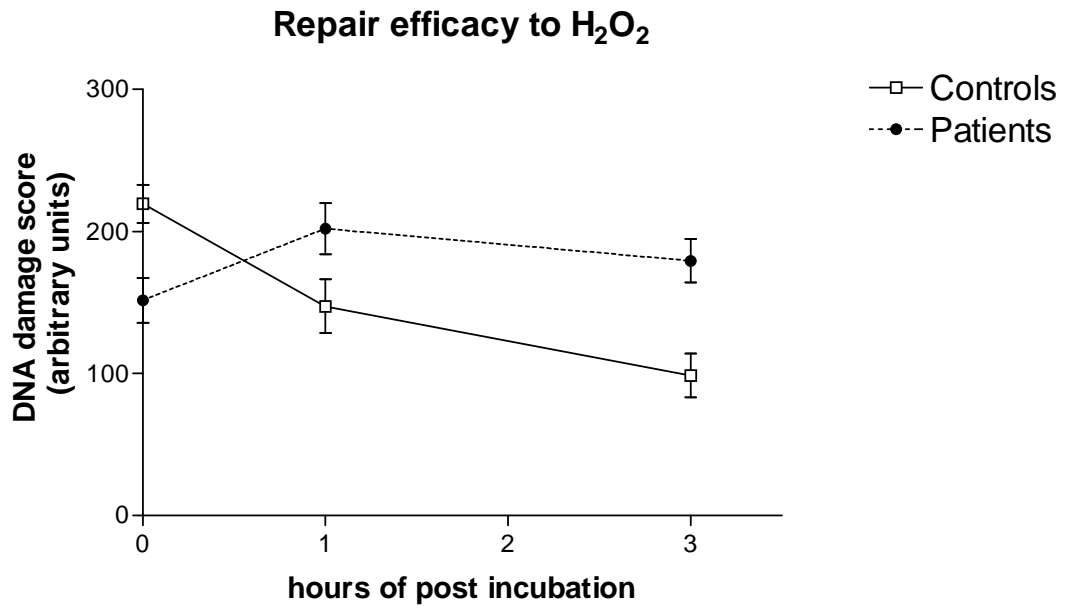


Figure 2B

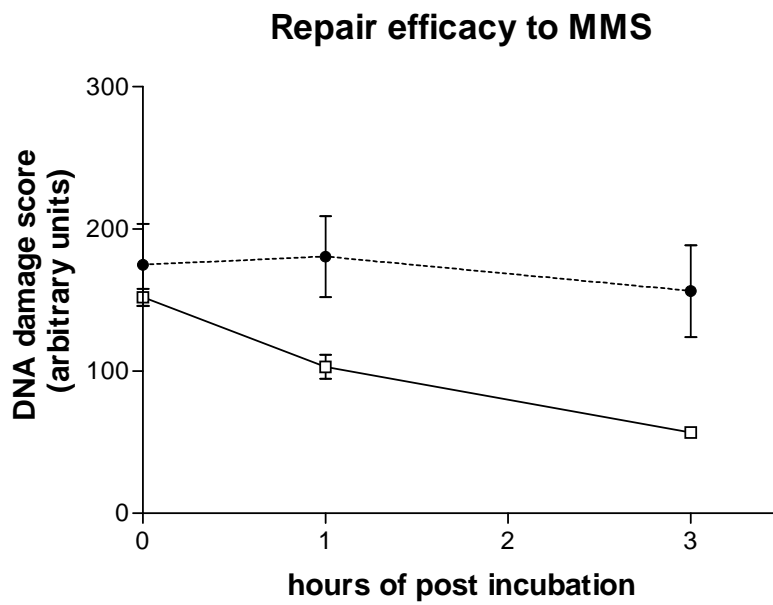




Figure 3A

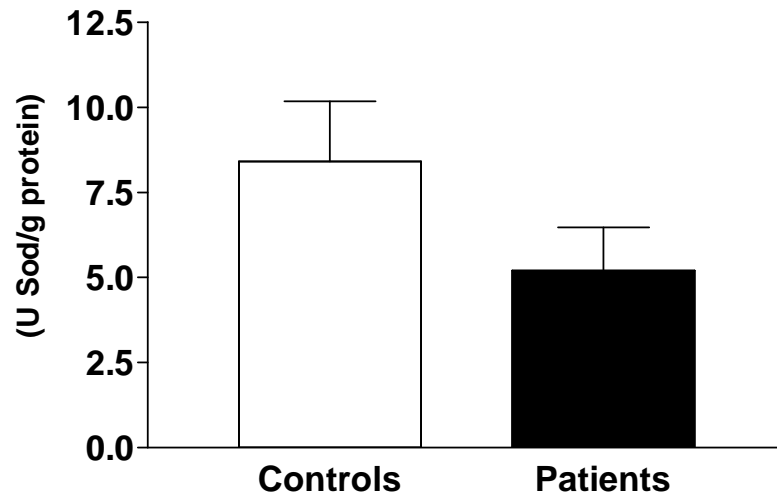


Figure 3B

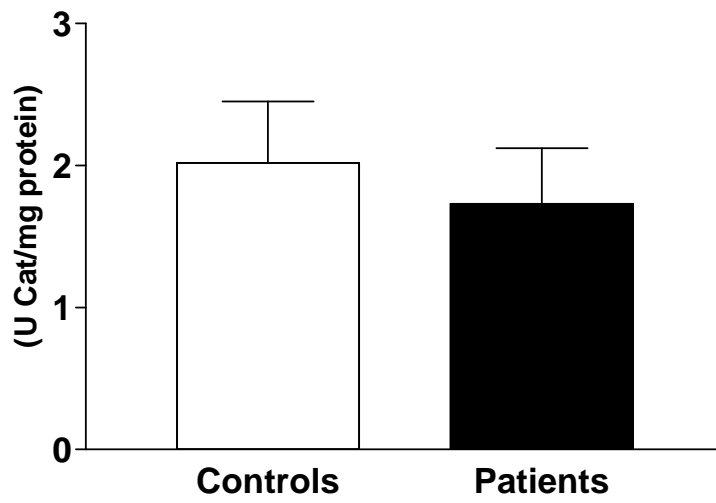


Figure 4A

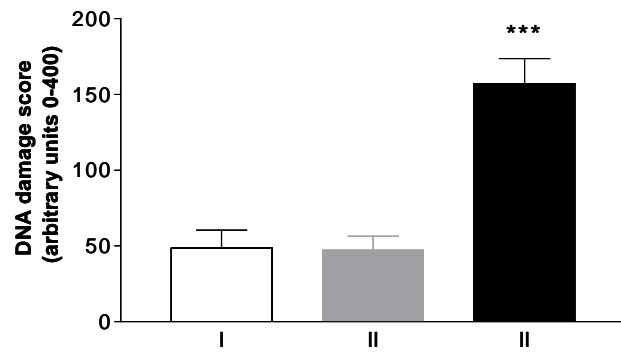


Figure 4B

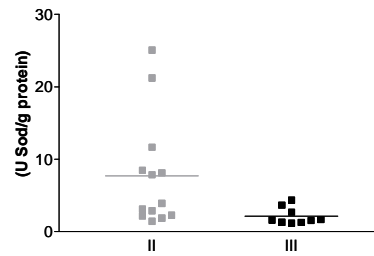
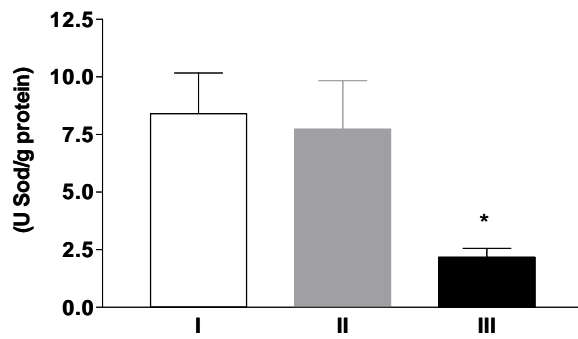
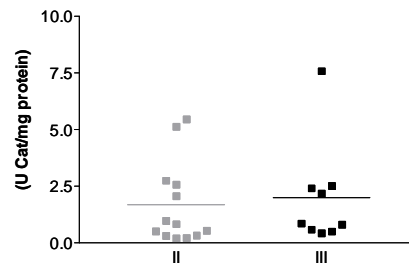
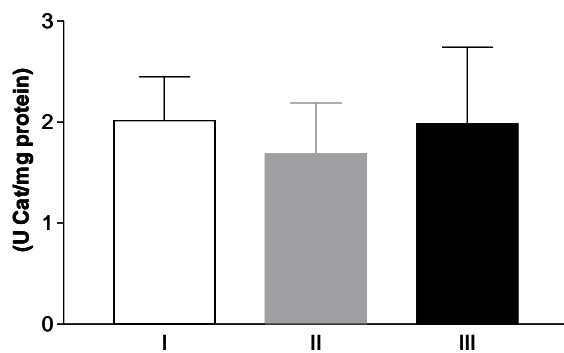


Figure 4C



**Table 1. Expression of some biomarkers in breast tissue of cancer women by immunohistochemistry.**

<i><b>Biomarkers</b></i>	<i><b>Immunohistochemistry staining</b></i>			
<b>Estrogen Receptor</b>	+	++	+++	
	36.4%	18.2%	45.4%	
+ (occasionally positive cells); ++ (until 1/3 of positive cells); +++ (more than 2/3 of positive cells)				
<b>Progesterone Receptor</b>	negative	+	++	+++
	27.3%	36.4%	9.0%	27.3%
negative (absence of positive tumor cells); + (occasionally positive cells); ++ (until 1/3 of positive cells); +++ (more than 2/3 of positive cells)				
<b>c-erB2 protein</b>	negative	+	++	+++
	22.8%	31.8%	36.4%	9.0%
negative (less than 10% of positive tumor cells); + (occasionally positive cells); ++ (until 1/3 of positive cells); +++ (more than 2/3 of positive cells)				
<b>p53 protein</b>	negative		positive	
	27.3%		72.7%	
negative (less than 5% positive tumor cells); positive (more than 5% positive tumor cells)				
<b>Ki-67 protein</b>	low index	moderate index	high index	
	43%	38%	19%	
Low index (less than 10% of positive tumor cells – low proliferation); moderate index (10-25% of positive tumor cells – moderate proliferation); high index (more than 25% of positive tumor cells – high proliferation)				

## **IV - CAPÍTULO II**

**Cell cycle and DNA damage evaluation in XPD deficient fibroblasts treated with  
the anti-neoplastic drug doxorubicin**

**Artigo a ser submetido a Mutation Research – Fundamental and Molecular  
Mechanisms of Mutagenesis**

**Cell cycle and DNA damage evaluation in XPD deficient fibroblasts treated with  
the anti-neoplastic drug doxorubicin**

<sup>1</sup>Agnoletto M. H., <sup>2</sup>Batista L.F. Z., <sup>2</sup>Carvalho H., <sup>1</sup>Guecheva T. N., <sup>3</sup>Delgado-Cañedo A.,  
<sup>4</sup>Amarante-Mendes G., <sup>1,5</sup>Henriques J. A. P., <sup>2</sup>Menck C. F. M., <sup>1,5</sup>Saffi J.

<sup>1</sup>Biophysics Department – UFRGS – Porto Alegre - Brazil;

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences– USP – São Paulo-  
Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Molecular and Celular Biology - IC/FUC

<sup>4</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences – USP – São Paulo-Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Genetic Toxicology - Lutheran University of Brazil – ULBRA Canoas,  
RS, Brazil.

\*Corresponding author: Laboratory of Genetic Toxicology; Avenida Farroupilha 8001,  
Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas- RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774;  
jenifer.saffi@ulbranet.com.br

## ABSTRACT

Most part of chemotherapeutic drugs target DNA and therefore the cytotoxicity of these agents is directly related to their ability to cause DNA damage. Doxorubicin is a drug widely used in breast cancer therapy that causes strand breaks and adducts in the DNA molecule. This drug also interferes with the unwinding of DNA during replication, either by binding to topoisomerase II and DNA or by releasing free radicals, depending on the dose used. DNA repair capacity is important not only for preventing malignant transformation but also influences the response to chemotherapy. Nucleotide Excision Repair (NER) is a highly conserved repair mechanism that involves more than 30 proteins, among them the XPD protein, which is a subunit of the TFIIH complex, involved both in transcription and repair. NER is primarily involved in the repair of bulky lesions, specially after UV irradiation, but its importance in the repair process of other types of damage like double strand breaks (DSB) has also been shown. Patients deficient in Xeroderma Pigmentosum (XP) genes present high sensitivity to sunlight and develop skin cancer in early age. In this study, we aimed to test the role of the XPD protein in the repair of DNA lesions and sensitivity of cells treated with doxorubicin. Cell lines carrying different mutations in the XPD gene were employed, each resulting in different patient clinical features, XP, TTD (trichothiodystrophy) and XP/CS (XP combined with Cockayne syndrome). Cells were treated with doxorubicin and analyzed for DNA damage, apoptosis levels and cell cycle arrest. The results clearly indicate that XPD and XP/CS cells are more sensitive to apoptosis induction, by this agent, than TTD and normal cells. DNA damage detected by comet assay was shown to be dose-dependent for all cell lines tested, but no repair of such lesions were detected in these cells. The induction of double strand breaks by doxorubicin was also investigated, as measured by the generation of  $\gamma$ H2AX nuclear *foci*. In this case, higher levels of lesions were observed for XP/CS and TTD cells, although both showed increased number of cells with these foci spontaneously. Although some differences in SSBs and DSBs were observed comparing the different cell lines, these types of lesions are probably not differently repaired in the cells. Most probably, other lesions, such as DNA adducts or even some products of the topoisomerase inhibition by DOX, may require XPD protein in its repair.

## INTRODUCTION

Most of the chemotherapeutic drugs target DNA and the cytotoxicity of these agents is directly related to their ability to cause DNA damage (Bonassa, 1998; Moustacchi, 2000; Blasiak et. al., 2004). The induction of these DNA lesions can lead to several different outcomes, such as replication and transcription blockage, mutagenesis and eventually cell death, helping to fight tumor cells, but also promoting deleterious effects as these damages are also usually linked to aging and tissue degeneration (Jiang et. al., 2004; De Waard et. al., 2004). Therefore, the DNA-repair efficiency in tumor cells is directly related to their resistance to chemotherapy (Madhusudan and Middleton, 2005; Pors and Patterson, 2005; Madhusudan and Hickson, 2005).

One of the most studied chemotherapeutic drugs is doxorubicin (DOX), a member of the anthracycline group, isolated early in the 1960s from *Streptomyces peucetius*. The mechanism of DOX action is still not completely known, although it is a topoisomerase inhibitor, that intercalates into DNA, perturbs the re-ligation step of topoisomerase II (topoII) resulting in the formation of the ternary drug-DNA-topoII 'cleavable complex', which finally leads to the formation of DNA double-strand-breaks (DSBs). Other effects have also been reported for DOX treatment, such as DNA adduct formation and free radicals release, which is thought to be responsible for the cardiotoxicity observed in clinical protocols. It has been shown that the formation of DNA adducts is formaldehyde-depend, while the release of free radicals is dependent on a one-electron redox cycling (Minotti et. al., 2004; Cutts et. al., 2005; Binaschi et. al., 2001). Moreover, as is usually the case for chemotherapeutic agents, cellular responses to treatment are also affected by drug concentration (Gewirtz, 1999) and cell-line specificity (Chlopkiewicz, 2002). Due to this broad range of DNA lesions induced by DOX, a major challenge is to describe the DNA repair pathways that are involved in drug resistance.

Among the several DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair (NER) is the most versatile one, being involved in the removal of helix-distorting lesions, such as ultraviolet (UV) light-induced photoproducts, and chemical adducts generated by exposure to aflatoxin, cisplatin and other genotoxic agents (Christmann et. al., 2003). It has also been shown that NER could be involved in the repair of other types of DNA

damage, such as DSBs (De Silva et. al., 2000). The NER pathway is composed of two sub-pathways: transcription coupled repair (TCR), that discriminates lesions present in the transcribed strand of active genes, and global genomic repair (GGR), that removes lesions from the rest of the genome (Bernstein et. al., 2002; Costa et. al., 2003; Cleaver, 2005). There are several human disorders related to defective NER proteins (TCR-NER, GGR-NER or both), which affect individual cancer proneness and even organism development, e.g. xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne's syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD) (Costa et. al., 2003; Christmann et. al., 2003; Cleaver, 2005). NER efficiency relies mostly on the action of the XP family of proteins, that have been assigned to seven complementation groups designated XPA to XPG, corresponding to proteins involved in different steps of the NER process, and a variant group designated XPV, that presents normal NER but a post-replicate repair deficiency. The XPD gene, with DNA-dependent ATPase and helicase function, is of particular interest, because mutations in this gene can result in at least three different clinical phenotypes. This complexity of clinical outcomes due to XPD mutation arises because each mutation site is specific for a particular disorder (Lehmann, 2001; Cleaver, 2005). In this sense, it has been shown that XP clinical features are a result of XPD mutations that affect NER but have little effect on transcription, while XP combined with CS (XP/CS) present a specific defect in the preferential repair of damage from actively transcribed regions of DNA (TCR). Conversely, TTD is also thought to be the result of transcriptional deficiencies (Lehmann, 2001; Bergmann and Egly, 2001; Cleaver, 2005).

The wide variety of XPD responses, depending on the mutations, led us to investigate the role of this protein in the resistance to DOX treatment. Wild-type and XPD mutated cells, presenting mutations in different regions of this gene (with clinical features of XPD, TTD and XP/CS) were treated with this drug and analyzed for apoptosis and DNA damage by comet assay. The formation of DSBs was also investigated directly by determination of  $\gamma$ H2AX nuclear *foci*. The results indicate that XPD and XP/CS cells are more sensitive to DOX treatment, when compared to wild type and TTD cells, confirming not only that the preponderant mechanism of DOX-induced apoptosis is through the formation of DNA damage, but also that NER is involved in the removal of DOX-induced lesions. However, although some differences in SSBs and DSBs were observed comparing the different cell lines, these types of lesions are probably not differently repaired in the cells. Most probably, other lesions



such as DNA adducts or even some products of the topoisomerase inhibition by DOX may require XPD protein in its repair.

## MATERIALS AND METHODS

### **Cell culture conditions**

Cells used in this work were SV40-transformed skin fibroblasts from biopsies of XP complementation group D patient (XP6BE-SV), XP combined with CS patient (XPCS2-SV) and TTD patient (TTD1VI-SV). MRC5 cells, SV transformed human fibroblast, normal for DNA repair, were used as wild type controls. Cells were routinely grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum (FCS; Cultilab, Campinas, Brazil), and 1% antibiotic and antimycotic (Invitrogen).

### **Flow cytometry analysis (FACS)**

Approximately  $2 \times 10^5$  cells were plated in 60 mm Petri dishes. Approximately 24 h later, cells were treated with different concentrations of DOX. Cells were kept in the presence or absence of DOX for 48 h, 72 h or 96 h. After this period, both adherent and detached cell populations were collected and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. Pelleted cells were resuspended in 100 µl of PBS, and fixed with ethanol 70% (stored – 20 °C). After fixation, the cells were centrifuged again, 1,500 rpm for 10 min, and the pellet resuspended in 334 µl of an RNase solution and 185 µl of propidium iodide (PI, 50 µg/mL). The PI fluorescence in the cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA).

### **Comet assay**

For the DNA damage measurements (SSBs) and repair efficacy, cells were treated with DOX for 3 h and further incubated for a short period, in culture medium, without the drug. Untreated cells and cells treated with MMS [ $8 \times 10^{-5}$  M] were also included as controls. The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al., 1988. Briefly, 20 µl of the cell suspension (~10,000 cells) were mixed with 90 µl 0.5% low melting agarose, spread on a precoated microscope slide and placed at 4°C for 5 minutes to allow for solidification. The cells were lysed in high salt and detergent and placed in a horizontal electrophoresis box. Subsequently, the cells were exposed to alkali

(300 mM NaOH / 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13) for 20 minutes at 4°C, to allow for DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. For electrophoresis, an electric current of 300 mA (25 V) was applied for 20 min at 4°C. After electrophoresis the slides were neutralized, stained with ethidium bromide, and analyzed using a fluorescence microscope (Axiovert 200, ZEISS, Germany). One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4). Thus, the damage score for each sample can range from 0 (completely undamaged – 100 cells × 0) to 400 (maximum damaged – 100 cells × 4). All assays were done in triplicate.

### **Statistical analysis**

Differences in the extent of DNA strand breakage, between the control and the treatments in dose-response studies, and the percent of apoptotic cells were tested for significance using ANOVA analysis of variance with Dunnett's Multiple Comparison Test. The values in repair kinetics studies were compared using Student's *t*-test. An alpha level of 0.05 was used to determine significance in all statistical analyses.

### **Immunofluorescent microscopy $\gamma$ H2AX foci**

Approximately  $2 \times 10^5$  cells were plated in 35 mm Petri dishes, containing a pre treat glass with polylysine (Sigma Co, St Louis, MO), and, 24 h later, cells were treated as indicated. After treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS, and permeabilized in 0.5% Triton X-100. After the cells were blocked with PBS plus (PBS + 100mM glycine + 0.5% BSA) for 1 h, the samples were incubated mouse monoclonal IgG anti- $\gamma$ H2AX (UPSTATE, NY) primary antibody (1:100) overnight at 4°C, followed with Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (InVitrogen) secondary antibody (1:200) for 2 h. Slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), the cover slip removed from the plate and mounted onto a glass slide. Cells were analyzed in a fluorescent microscope.

## RESULTS

### **Apoptosis induction after DOX treatment**

The first aim of this study was to determine the sensitivity of XPD, XP/CS and TTD cells to apoptosis induction by DOX. Figure 1 (A and B) shows the increase of sub-G1 cell population (representing apoptotic cells) with time after treatment with DOX. XPD and XP/CS cells are more sensitive than TTD and normal cells (MRC5) to low dose of DOX (1A), while XP/CS cells were the most sensitive to high dose of DOX (1B). This result correlates well with the higher sensitivity of XPD and XP/CS to UV induced apoptosis, compared to TTD and normal cells (Armellini et. al., 2004). These results indicate that a defective NER pathway might be involved in the sensitivity that XPD and XP/CS cells present to DOX. Besides, the differences between low and high doses of DOX may reflect differences in the action mechanisms of this drug, depending on the dose employed as suggested by other authors (Gewirtz, 1999).

### **Influence of DOX on Cell Cycle**

DOX influences cell metabolism by many ways, depending on dose concentration used, time of drug exposure and type of cell line (Gewirtz 1999; Chlopkiewicz 2002; Minotti et. al., 2004) and for this reason its precise action mechanism still remains obscure. DOX also interferes with cell cycle progression and it has been shown that cellular damage caused by DOX can promote checkpoint arrest in both G1 and G2 phases of the cell cycle (Siu et. al., 2004). Therefore we have decided to analyze the effect of DOX in this XPD-defective cell model. In Figure 2A, it is possible to observe that MRC5, TTD and XP/CS cells presented an intensive arrest at G2 after treatment with 0.2 µg/mL of DOX. Surprisingly, XPD cells did not present this arrest. However, after treatment with 0.6 µg/mL (Figure 2B) there was no checkpoint arrest in any of the cell lines studied, most probably because the cells enter in apoptosis after such high DOX doses.

### **Influence of Reactive Oxygen Species in DOX-induced apoptosis**

Cardiotoxicity is an important side effect of DOX in clinical trials, and this is probably mainly caused by free radicals release after DOX treatment (Minotti et. al., 2004; Outomuro et. al., 2006). To understand if free radicals were playing a role in apoptosis induction after DOX treatment, the cells were kept in medium containing the free radicals scavenger N-acetylcysteine (NAC) and analyzed by FACS. The results (Figure 3) indicate that, in these cells, apoptosis was not prevented by NAC. Thus, the free radicals release does not seem to be involved in apoptosis induction by DOX.

### **DNA damage evaluation and repair**

DNA damage induction and DNA repair efficiency in these cells was checked by comet assay. The alkaline version of the comet assay is used for the detection of different types of DNA damage such strand-breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA and DNA-protein cross-links (Collins, 2004).

Figure 4 shows that DOX induced DNA damage in a dose-dependent manner for all cell lines tested. All cell lines presented significant DNA damage level at the 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dose of DOX, when compared to the non-treated cells. Therefore this indicates that DOX induces lesions on the DNA molecule that can be discriminated in alkaline comet assays.

We also investigated the kinetics of removal of such damages from the DNA of treated cells (Figure 5). Different to what occurs with MMS, after 3 hours of post-incubation with DOX, there was no reduction in the DNA damage score in all cell lines. Moreover, mutations in the XPD gene do not influence the repair of DOX-induced DNA damage, since there was no difference in the repair efficiency of these cell lines (Figure 5).

### **Formation of DSB by DOX treatment: $\gamma\text{H2AX}$ foci.**

The identification of  $\gamma\text{H2AX}$  foci in the nuclei of DNA damaged cells has provided a valuable and highly sensitive method to monitor DSBs (Rogakou et. al., 1998; MacPhail et. al., 2003; Banáth and Olive, 2003; Bouquet et. al., 2006). To confirm the induction of DSBs by DOX, the nuclear  $\gamma\text{H2AX}$  foci formation was determined by immunocytochemistry. In fact, DOX induces  $\gamma\text{H2AX}$  foci formation in all

cell lines in a time dependent manner (Figure 6). Interestingly, non-treated TTD and XP/CS cell lines presented significant amounts of DSB, which could be correlated with the kind of mutation of these cells. After 6 hours of DOX treatment, all four cell lines, showed high levels of  $\gamma$ H2AX *foci*, although the formation of DSB in XPD cells seems to be slower than the others cell lines studied in this work. As already suggested by Banáth and Olive (2003) these DSBs can be caused by topoisomerase II inhibition, as this may form a ternary complex (DOX-DNA-topoII) which would generate breaks in the DNA molecule (Minotti et. al., 2004).

## DISCUSSION

NER is a highly conserved repair mechanism involved in the repair of UV-induced lesions and other bulky ones, as chemical adducts generated from exposure to aflatoxine and other genotoxic agents (Christmann et. al., 2003), as well as in DSB (De Silva et. al., 2000). DOX is a widely used drug in cancer therapy, mainly for solid tumors, leukemias and lymphomas (Outomuro et al., 2006). This drug is known for its topoisomerase II inhibitor effect, however, other types of DNA damage have already been reported, such as base adducts formation and DNA damage by the release of free radicals (Minotti et. al., 2004; Cutts et. al., 2005; Binaschi et. al., 2001).

The topoisomerase family of enzymes catalyzes the unwinding of DNA for transcription and replication, involving the process of the double strand DNA of the first duplex and passing a second duplex through the transient cleavage (Liu et. al., 1983). DNA topo II is required by eukaryotic cells to separate intertwined catenated daughter chromatids produced by DNA replication. Complete chromatid decatenation is required for accurate chromatid segregation. DOX can prevent chromatid decatenation, consequently leading to polyploid cell formation (Deming et. al., 2001). Skoufias et. al. (2004) have showed that failure of DNA decatenation induced by topo II inhibitor caused metaphase arrest and that the arrest occurred in the absence of any evident DNA damage. In this work, we did not observe 8n cell formation after treatment with DOX, but the arrest at G2 phase could be indicating the delay on the decatenation process and, consequently, accumulation of 4n cell (Figure 2)

XPD cells presented the highest death levels, comparing to the other cell lines after treatment with low concentrations of the drug (0.2  $\mu$ g/mL) (Fig. 1A). This high

sensitivity of XPD cells are probably the cause of a non arrest at G2, opposite to what was observed with the other cell lines, which do arrest at G2. On the other hand, treatment of these cells with high DOX concentration (0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) did not induce G2 arrest in any of the cells studied. As a consequence of this lack of arrest, the apoptosis levels increased in all cell lines (Fig. 1B) in comparison to the treatment with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Surprisingly, after treatment with 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , XP/CS cells were more sensitive to apoptosis induction than XPD cells, confirming previous results that show that DOX cell death-inducing mechanisms are strongly dependent on the concentration used. These results can be compared with the data obtained after UV treatment, where XPD and XP/CS were more sensitive than TTD and normal cell lines to apoptosis induction (Armellini et. al., 2004). However, in the present work, the concentration of the drug was a key determinant to the sensitivity of the cell lines studied.

It has been shown that DOX can be pre-activated by formaldehyde to yield the doxoform compound, which consists of two drug molecules bound together with three methylene groups (Fenick et. al., 1997) and that this pre-activated form is more cytotoxic than DOX (Taajes et. al., 1999). Swift et. al. (2006) showed that the cytotoxic potential of DOX can be increased dramatically, resulting in the induction of apoptosis under conditions previously regarded as nontoxic and that the cytotoxic lesion responsible for the enhancement of DOX-induced cell death seems to be a formaldehyde-mediated DOX-DNA adducts. Although our results show that the DNA damage caused by DOX was dose-dependent, our comet assays did not detect any significant differences in the induction of lesions by DOX among the cell lines studied, possibly because we are not detecting adducts by this technique. Furthermore, we did also not detect a reduction of the DNA damage amounts caused by DOX after 3 hours of post-incubation. So, the differences in sensitivity presented in the different NER deficient cell lines, as well as the wild-type MRC5 cells, are more likely to be caused by other kind of DNA damage, that could not be detected by alkaline comet assay, such as DNA adducts.

The phosphorylation of H2AX has been used as a good method to monitor DSBs formation (Rogakou et. al., 1998; MacPhail et. al., 2003; Banáth and Olive, 2003; Bouquet et. al., 2006). Kurz et. al. (2004) have showed that DOX induces the phosphorylation of histone H2AX in Ser 139 using a concentration of 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In this work, we have also observed that DOX induces  $\gamma\text{H2AX}$  foci formation at 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dose, in both deficient and proficient XPD cells and in a time-dependent manner. The

formation of these DSBs after DOX is probably related to the inhibition of topoII, which perturbs its re-ligation step, and eventually results in the formation a ternary complex (DNA-DOX-TopoII) that finally leads to DSB formation. Interestingly, TTD and XP/CS presented foci formation even in non-treated conditions, which could be related to the kind of mutation presented by these cell lines. The TTD phenotype is characterized by the deficiency of gene transcription, and is generally considered as a defective transcription syndrome (Bergmann and Egly, 2001). XP/CS syndrome presents XP and CS characteristics, and are deficient in nucleotide excision repair, including the subpathway of transcription-coupled repair (Lehmann, 2001). A large number of endogenous metabolites, like free radicals, are formed inside of the cell in response to normal processes of cellular multiplication. Thus, these spontaneous DSBs can be due to a defect in DNA damage repair from endogenous metabolites.

Our results indicate that NER can be involved in the removal of DNA lesions caused by DOX, whereas mutation in the XPD gene, which results in XP and XP/CS features, could have a fundamental role on the DOX sensitivity. We believed that the DOX mechanism of action in XPD-deficient cells are dependent on the dose utilized, as well as on the kind of DNA damage induced by the drug. The low strand breaks levels observed after treatment with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX, detected by comet assay, could indicate little participation of these damages in the induction of apoptosis by DOX. The results obtained with NAC show that the free radicals release by DOX in this dose do not participate on the cell death process either. Although DOX induced a great number of strands breaks after 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX incubation, none of the cell lines were able to repair these DNA damages in 3 hours, thus we can not correlate the difference in the XPD-deficient cell lines sensitivity with the strand breaks detected by comet assay. Therefore, one might suggest that DNA-adducts induced by DOX could be responsible for the different sensitivities observed among the XPD- mutated cell lines. However, more experiments are necessary to demonstrate the mechanism involved in this death process.

NER is classically known by its action on DNA damage caused by UV, whereas until this moment little is known about the response of NER-deficient cell lines to anti-tumoral drugs like DOX. To our knowledge, this is the first work demonstrating the DOX sensitivity of XPD-deficient fibroblasts, mutated in different parts of the gene. We believe that studies done in this direction are of fundamental importance, since repair mechanisms play an important role in the mantainance of the genomic integrity of the

cells, which, in a tumor background, could be responsible for the resistance that they present to certain anti-tumoral therapies.

## REFERENCES

- Armellini MG, Muotri AR, Marchetto MCN, Lima-Bessa KM, Sarasin A, Menck CFM (2004). Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. *Cancer Gene Therapy* 12:389-396
- Banáth JP and Olive PL (2003). Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Research* 63:4347-4350
- Bergmann E and Egly JM (2001). Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends in Genetics* 17:279-286
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, 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
- Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G and Animati F (2001). Antracyclines: Selected new developments. *Curr Med Chem – Anti-Cancer Agents* 1:113-130
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zadrozny M (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res* 554:39-148
- Bonassa, E (1998). *Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Atheneu Ed. ISBN 85:7379-047-4
- Bouquet F, Muller C, Salles B (2006). The loss of  $\gamma$ H2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5:1116-1122
- Chlopkiewicz B (2002). Evaluation of adriamycin induced DNA damage and repair in human and animals cells. *Acta Pol Pharm* 59:115-120
- Christmann M, Tomicic MT, Ross WP, Kaina B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34
- Cleaver JE (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nature Reviews – Cancer* 5:564-573



- Collins AR (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26:249-261
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083-1099
- Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A and Phillips DR (2005). The power and potential of Doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* 57:73-81
- De Waard H, de Wit J, Andressoo JO, van Oostrom CTM, Riis B, Weimann A, Poulsen HE, van Steeg H, Hoeijmakers JHJ and van der Horst GTJ (2004). Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 24:7941-7948
- De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH and Hartley JA (2000). Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 20:7980-7990
- Deming PB, Cistulli CA, Zhao H, Graves PR, Piwnica-Worms H, Paules RS, Downes CS, Kaufmann WK (2001). The human decatenation checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12044-12049
- Fenick DJ, Taajes DJ, Koch TH (1997). Doxoform and daunoform: anthracycline-formaldehyde conjugates toxic to resistant tumor cells. *J Med Chem* 40:2452-2461
- Gewitz DA (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57:727-741
- Jiang M, Xiaolan Y, Stephen H, Cong-Yi W and Dong Z (2004). Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:1140-1147
- Kurz EU, Douglas P, Less-Miller SP (2004). Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279:53272-53281
- Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL (1983). Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 258:15365-15370
- Lehmann AR (2001). The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15:15-23

- MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL (2003). Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 79:351-358
- Madhusudan S and Hickson, ID (2005). DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *TRENDS in Molecular Medicine* 11:503-511
- Madhusudan S, Middleton MR (2005). The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 31:603-617
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumoral Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56:185-229
- Moustacchi E (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 364:35-40
- Outomuro D, Grana DR, Azzato F, (2006). Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem? *Int J Cardiol* Article in press
- Pors K, Petterson LH (2005). DNA mismatch repair deficiency, resistance to cancer chemotherapy and the development of hypersensitive agents. *Curr Top Med Chem* 5:1133-1149
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
- Singh NP, McCoy T, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-192
- Siu WY, Lau A, Arooz T, Chow JPH, Ho HTB, Poon RYC (2004). Topoisomerase poisons differentially activate DNA damage checkpoint through ataxia-telangiectasia mutated-dependent and independent mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* 3:621-632
- Skoufias DA, Lacroix FB, Andreassen PR, Wilson L and Margolis RL (2004). Inhibition of DNA decatenation, but not DNA damage, arrests cells at metaphase. *Molecular Cell* 15:977-990
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR and Cutts SM (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 66:4863-4871

Taajes DJ, Fenick DJ, Koch TH (1999). Nuclear targeting and nuclear retention of anthracycline-formaldehyde conjugates implicates DNA covalent bonding in the cytotoxic mechanism of anthracyclines. *Chem Res Toxicol* 12:588-596

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1. Apoptosis induction after treatment with DOX.** Cell were treated either with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A) or 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B) of DOX and analyzed by flow cytometry at the indicated times with the drug. The amount of apoptotic (sub-G1) cells induced are indicated for XPD ( $\square$ ), XP/CS ( $\circ$ ), TTD ( $\Delta$ ) and MRC5 ( $\blacksquare$ ) cells. Each value represents the mean ( $\pm$  standard error) of three individual experiments.

**Figure 2. Cell cycle analysis after DOX treatment.** XPD, XP/CS, TTD and MRC5 were treated with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A) and 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B) of DOX. At the times indicated cell populations were collected and had their nuclei isolated and stained with PI for FACS analysis. Each value represents the mean ( $\pm$  standard error) of three individual experiments.

**Figure 3. Free radicals are not involved in DOX-induced apoptosis.** XPD (A), XP/CS (B), TTD (C) and MRC5 (D) cells were pre-treated with 5 mM of N-acetylcysteine (NAC) 30 minutes before and during treatment with 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DOX. Both adherent and detached cell populations were collected at the indicated times for sub-G1 determination by FACS analysis.

**Figure 4. DOX induced DNA damage in a dose dependent manner.** The DNA damage score induced after 3 hours of the treatment by DOX (at the indicated doses) and MMS ( $8 \times 10^{-5}\text{M}$ ) in XPD-deficient and proficient fibroblasts was determined by alkaline comet assay. One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4), and the DNA damage score determined as described in Material and Methods.

**Figure 5. Kinetics of DNA damage removal after DOX treatment.** The cells were treated with DOX at the indicated doses and incubated without the drug for additional 1 or 3 h, before DNA damage score by alkaline comet assay, as in Figure 4.

**Figure 6. Doxorubicin induces  $\gamma\text{H2AX}$  foci in normal and XPD deficient fibroblasts.** The cell lines were treated either for 2 hours (middle columns) or 6 hours (right columns) with 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DOX and immediately stained with antibody specific for  $\gamma\text{H2AX}$  and DAPI (as describe in methods).

Figure 1A

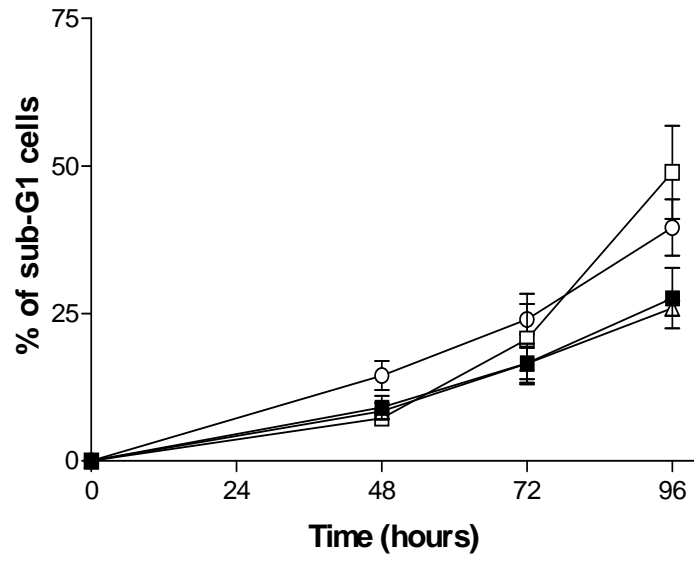


Figure 1B

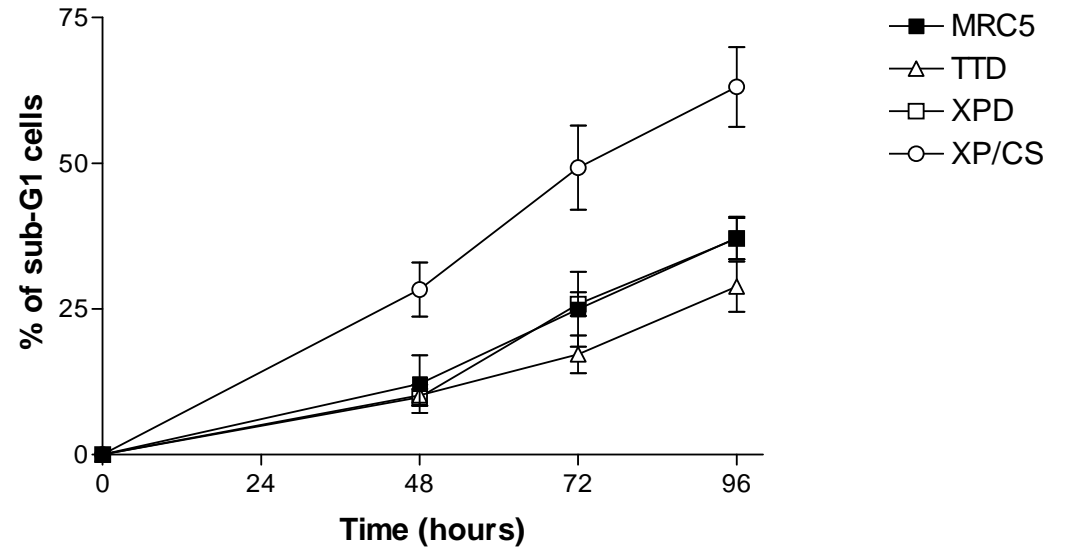


Figure 2A

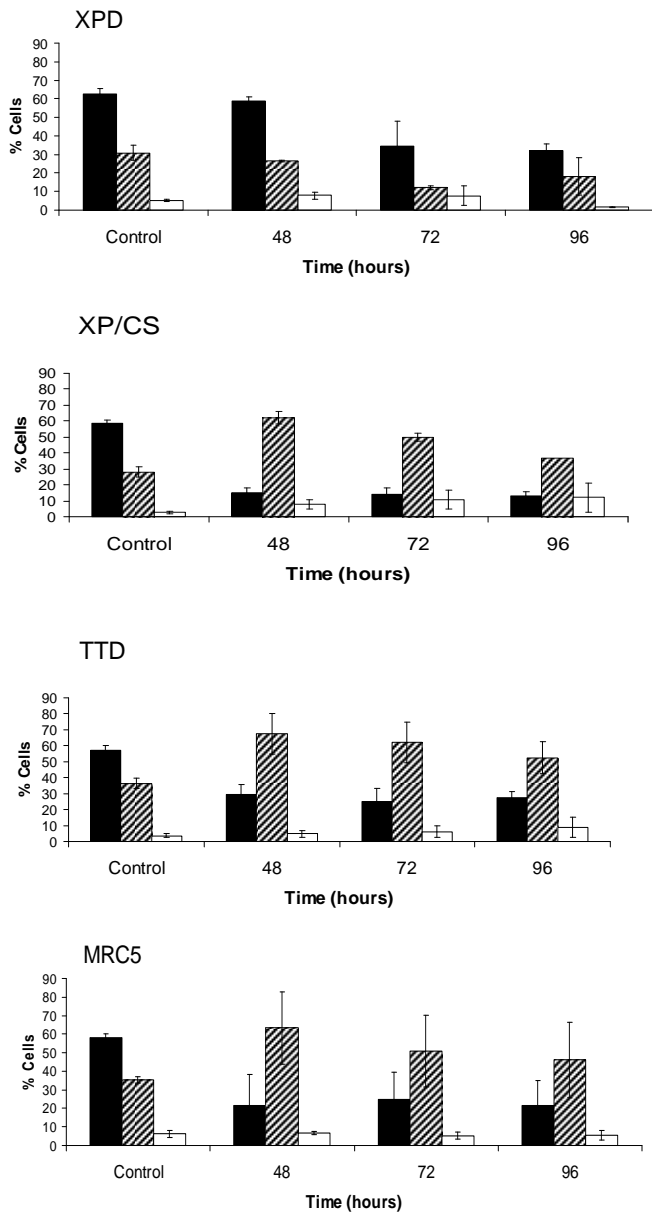


Figure 2B

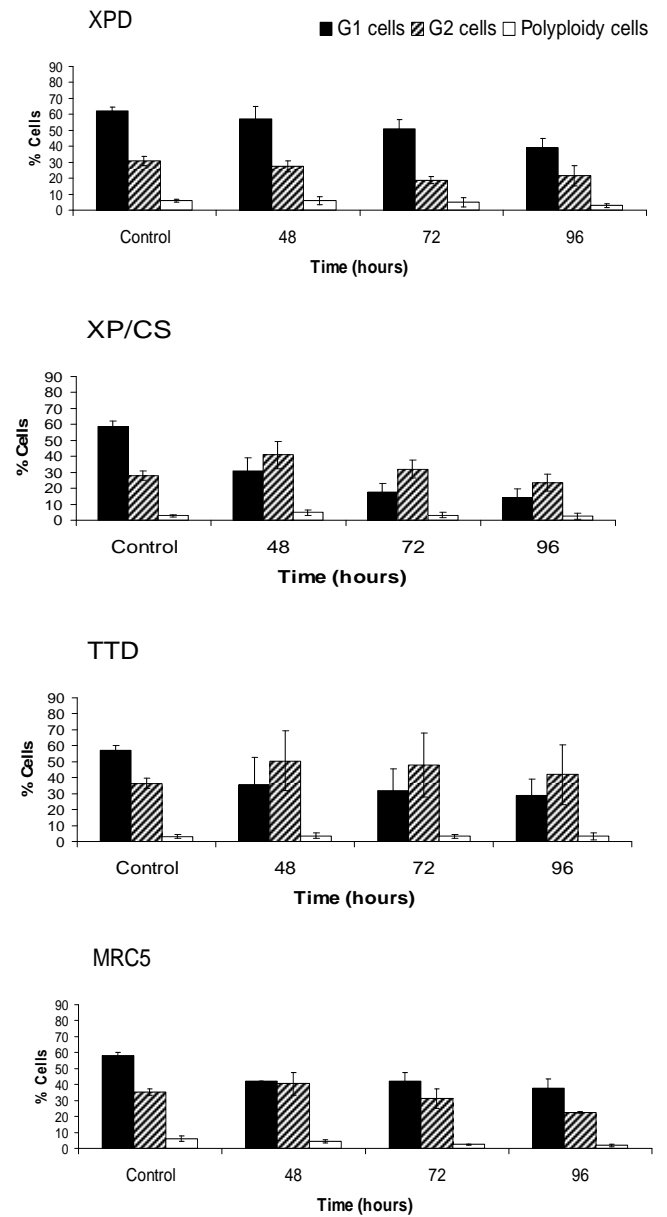


Figure 3A

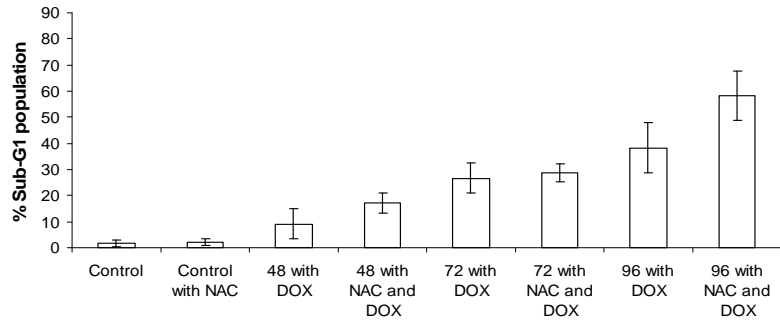


Figure 3B

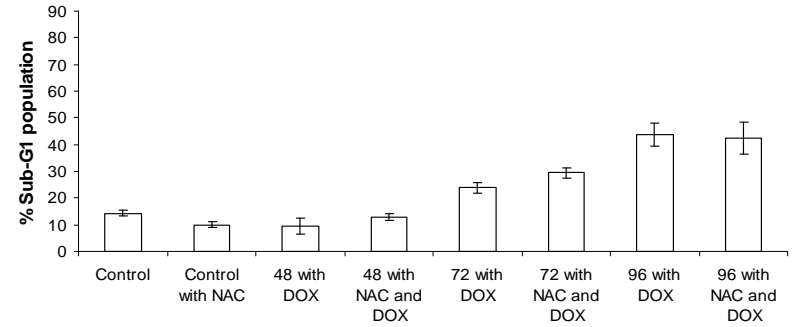


Figure 3C

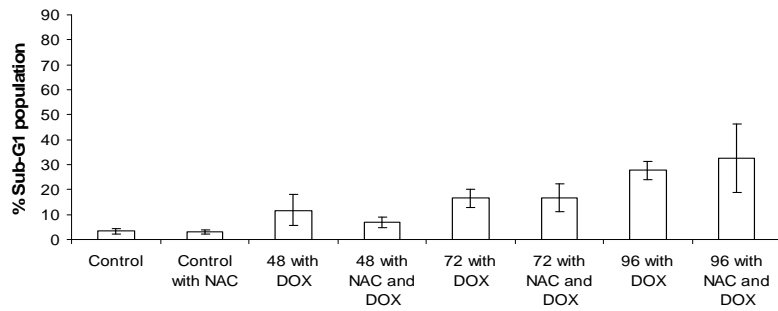


Figure 3D

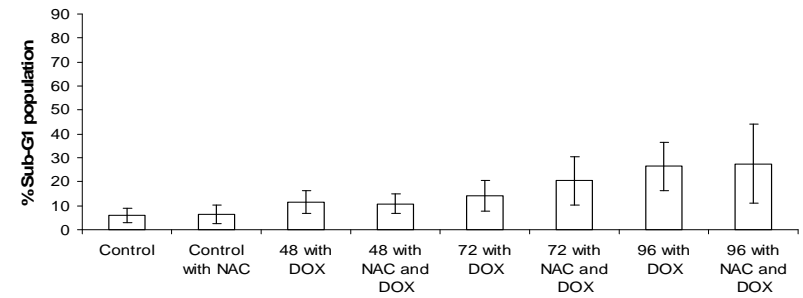


Figure 4

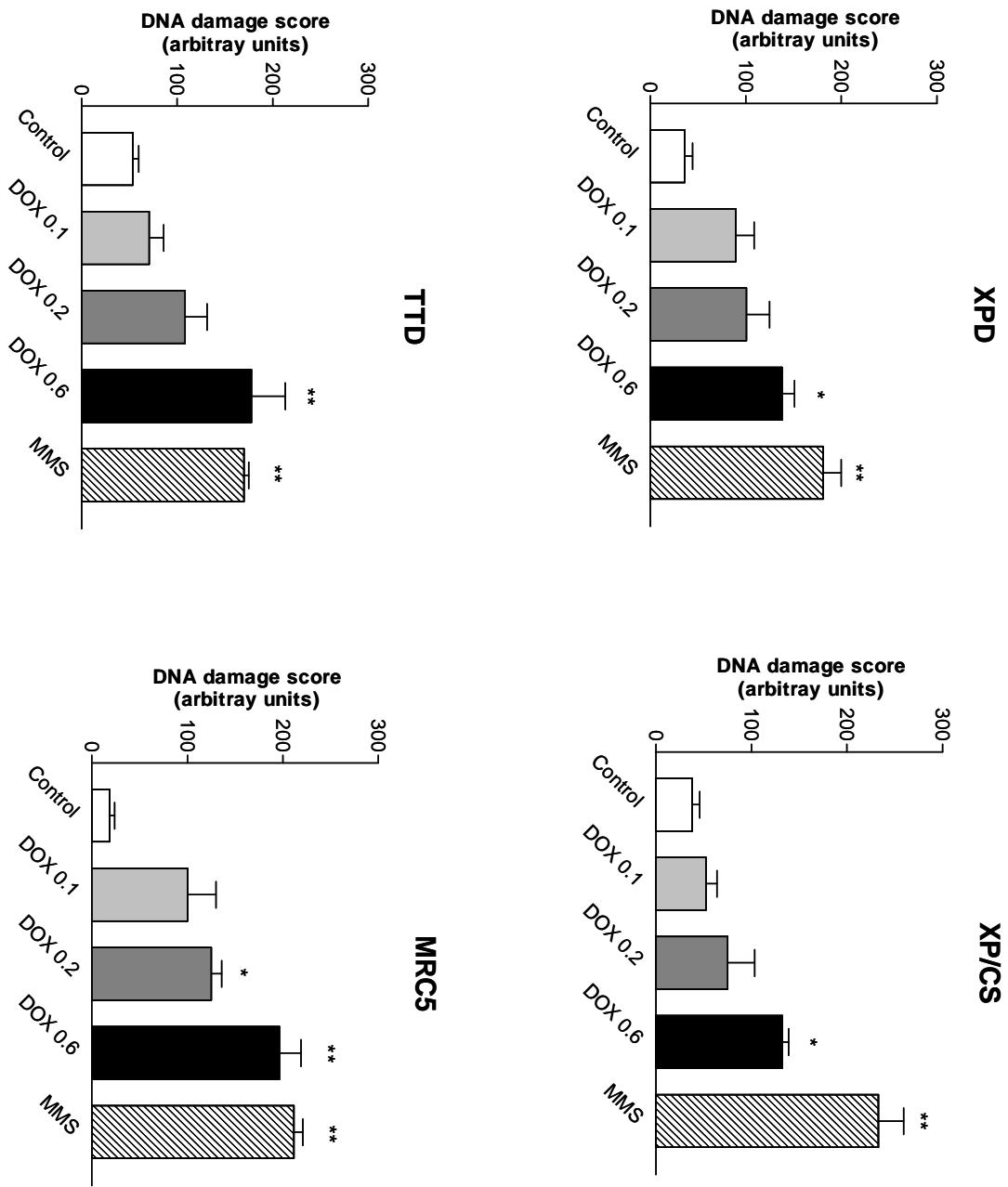




Figure 5

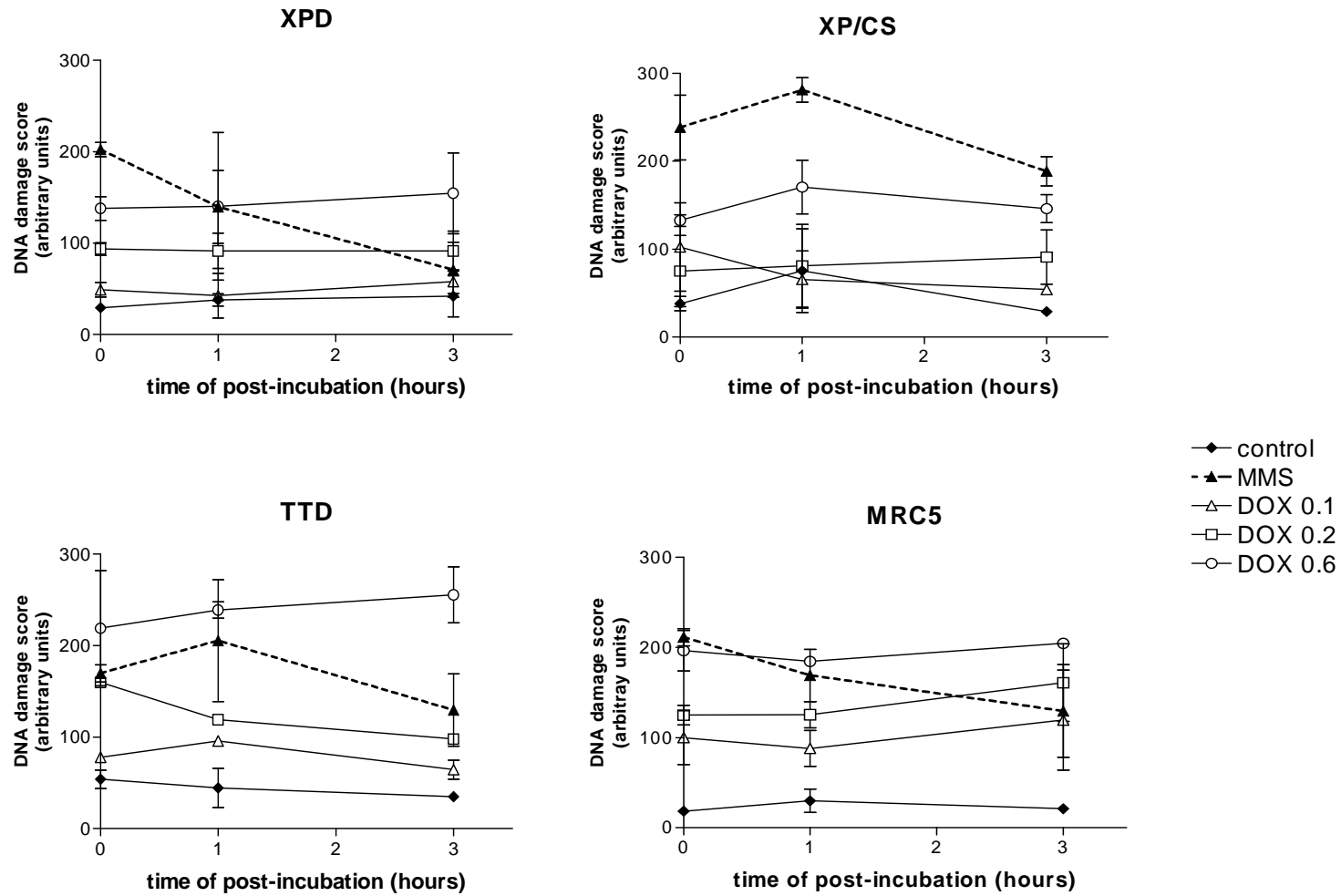
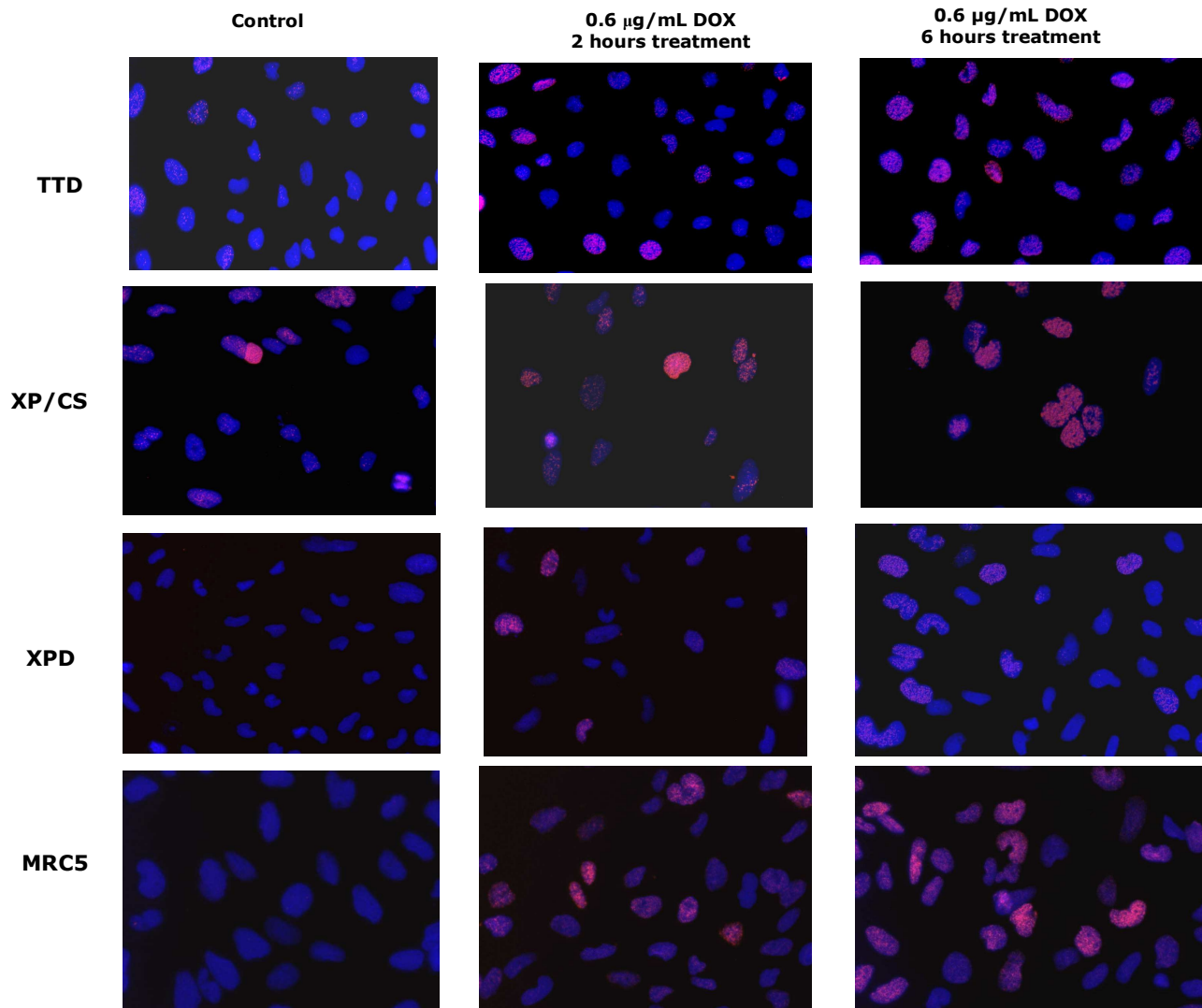


Figure 6



## **V - DISCUSSÃO GERAL**

### **1. Análise dos danos no DNA e do perfil antioxidante de pacientes com câncer de mama**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo, matando cerca de seis milhões de pessoas por ano (Almeida et. al., 2005). Decorrente desses resultados, somado aos provenientes do Instituto Nacional do Câncer (INCA), torna-se evidente a preocupação da população com a emergência de doenças como o câncer. Essa é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, principalmente pela direta relação com mortalidade e dor, atribuída ao processo tumoral. No Brasil, o câncer de mama é o câncer com maior incidência entre as mulheres, sendo que a região sul do país contribui com 20% desse número, perdendo somente para a região sudoeste, com mais de 50% ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)). Segundo os dados apresentados pelo INCA, o qual mostrou a distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo a localização primária do tumor, em mulheres, para os períodos entre 1979 e 1983 e entre 1995 e 1999, o câncer de mama é o causador do maior número de mortes no estado do Rio Grande do Sul, e o que mais assusta é o aumento ocorrido entre esses períodos, passando de 13% para 15%. Assim, fica evidente a importância desse tipo de tumor nesse estado.

Os fatores que se associam ao aumento do risco de se contrair uma doença são chamados de fatores de risco. Para o câncer de mama, alguns fatores, como tabagismo, álcool, uso de contraceptivo oral, idade da menarca, reposição hormonal, assim como fatores genéticos estão associados com a predisposição ao desenvolvimento desse tipo de tumor (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Em nosso trabalho, não encontramos nenhuma correlação direta entre os fatores de risco e o desenvolvimento do câncer de mama (capítulo 1). Apesar das pacientes com câncer de mama apresentarem uma maior exposição aos raios ultravioleta (UV) comparados com os controles, e não relatarem cuidados com proteção, não se pode afirmar que há uma correlação direta entre a exposição desses indivíduos aos raios UV e o desenvolvimento tumoral.

A suscetibilidade individual ao câncer é um fator importante no risco a doenças e é influenciado por fatores do hospedeiro, como a suscetibilidade a agentes danificadores do DNA. A capacidade de reparo de danos no DNA é essencial para a sobrevivência celular, assim como na resposta a agentes agressores e,

conseqüentemente, no desenvolvimento dos processos tumorais. Atualmente, os mecanismos de reparo têm recebido atenção não somente pelos aspectos ligados à manutenção da integridade genômica, mas também nos processos relacionados a resistência de alguns tumores à terapia antitumoral. Assim, a detecção de falhas em processos de reparo torna-se de fundamental importância, não somente para o diagnóstico e caracterização dos tumores, mas também para possíveis estratégias de terapia antitumoral (Madhusudan e Hickson, 2005).

A detecção e caracterização dos tumores a partir de biópsias teciduais são procedimentos rotineiros no diagnóstico de diversos tipos de cânceres. A descoberta e utilização de novos métodos e biomarcadores para a detecção de indivíduos com suscetibilidade de desenvolver tumores têm ganhado ênfase entre os pesquisadores, uma vez que a facilidade de análise, bem como o estágio de detecção da doença são fundamentais para o sucesso da terapia antitumoral e para a sobrevivência dos pacientes.

Para determinar, tanto os danos endógenos no DNA como a capacidade dos linfócitos de pacientes com câncer de mama de reparar as lesões induzidas pelo peróxido de hidrogênio, nós utilizamos o ensaio cometa alcalino, um ensaio rápido, prático e de fácil manuseio, o que pode possibilitar um resultado de biomonitoramento de genotoxicidade em curto tempo (Collins, 2004; Brendler-Schwaab et. al., 2005). Estudos realizados com linfócitos de sangue periférico de pacientes com câncer de mama revelaram uma menor capacidade de reparo dessas células aos danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio e a droga antitumoral doxorrubicina, quando comparados com indivíduos sem tumores (Blasiak et. al., 2004). Os nossos resultados confirmaram não somente essa menor capacidade de reparo às lesões induzidas pelo peróxido de hidrogênio (capítulo 1, figura 2A), como também mostraram um acúmulo de danos endógeno no DNA desses pacientes (capítulo 1, figura 1A). Outros autores já citaram esse acúmulo endógeno em pacientes com câncer, sendo que esses indivíduos apresentaram também um aumento dessas lesões após alguns ciclos de quimioterapia (Nadin et. al., 2005). Este perfil, entretanto, não foi observado em nossos pacientes, uma vez que os níveis de lesões no DNA foram semelhantes, antes e após alguns ciclos de tratamento (capítulo 1, figura 1B).

Muitos indutores de lesões no DNA provêm do próprio metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim sendo, é de fundamental importância o adequado funcionamento dos mecanismos de manutenção da integridade genômica. Além dos mecanismos de reparo de danos no DNA, as enzimas antioxidantes

desempenham um papel importante para manter os níveis de radicais livres na célula, evitando um possível desenvolvimento de estresse oxidativo. A suscetibilidade de um organismo ao estresse oxidativo depende do equilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante. Ambas as enzimas SOD e CAT funcionam como anti carcinogênicos por inibirem o início e a promoção/transformação do processo carcinogênico (Kumaraguruparan et. al., 2005).

Os níveis de defesa antioxidante em tecidos tumorais têm sido largamente estudados e correlacionados com o desenvolvimento de tumores. Vários autores avaliaram a atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) em tecidos tumorais, mostrando que nesses tecidos, as enzimas SOD e GPx têm uma atividade aumentada, quando comparado com tecidos sem tumores (Oytun et. al., 2000; Portakal et. al., 2000; Ray et. al., 2000; Kumaraguruparan et. al., 2002; Tas et. al., 2005). Enquanto isso, outros estudos têm determinado a atividade dessas enzimas no plasma de sangue periférico de pacientes com câncer. Os resultados são contraditórios, uma vez que muitos relatam um aumento na atividade de SOD, CAT e GPx (Güven et. al., 1999; Yeh et. al., 2005), enquanto outros (Abiaka et. al., 2002) mostraram uma diminuição em tais atividades enzimáticas. Interessantemente, em nossos resultados não observamos uma diferença significativa entre a atividade de SOD e CAT de pacientes com câncer de mama em relação aos indivíduos controles (capítulo 1, figura 3A e B, respectivamente).

Alguns estudos mostraram que houve uma variação interindividual de lesões no DNA nos pacientes com câncer, o que nos levou a avaliar possíveis variações entre os nossos pacientes com câncer de mama (Nadin et. al., 2005; Blasiak et. al., 2004). Para analisar tais variações, as pacientes foram divididas entre as que apresentavam altos níveis de lesões no DNA (escore acima de 100) e aquelas pacientes que apresentavam baixos níveis de danos no DNA (escore abaixo de 100), com objetivo de correlacionar esses resultados com a atividade das enzimas antioxidantes. Nessa análise, foi possível verificar uma correlação entre os níveis de lesões endógenas no DNA de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de mama com o perfil antioxidante do plasma desses indivíduos (capítulo 1, figura 4). Esses resultados mostraram que pacientes com altos níveis endógenos de danos no DNA apresentaram uma baixa atividade de SOD (capítulo 1, figura 4B). Estes resultados poderiam indicar um acúmulo de danos oxidativos no DNA desses linfócitos, os quais podem provir do próprio metabolismo celular. Um trabalho realizado por Liu et. al. (2003) demonstrou que uma menor

capacidade antioxidante total de células coletadas por pleurocentese de derrame pleural maligno pode estar correlacionado ao maior nível de danos no DNA apresentados pelos linfócitos provindos desse derrame.

Atualmente, não há testes/ensaios que possam monitorar a resposta de doenças a quimioterapia. Medir a sensibilidade individual para drogas quimioterápicas, como doxorrubicina, em que o DNA é o principal alvo, poderia ajudar a melhorar a eficácia e o limite de toxicidade de agentes antitumorais. A realização de ensaios utilizando linfócitos de sangue periférico, como o ensaio cometa e ensaios bioquímicos (ex. medida da atividade de enzimas antioxidantes), poderia auxiliar no monitoramento de pacientes submetidos a drogas quimioterápicas, bem como a outros métodos de terapia (imunoterapia e radioterapia) e outras doenças (hepatite). Apesar de mais estudos serem necessários para confirmar a utilização desses ensaios no biomonitoramento de toxicidade de agentes utilizados em terapias, como a do câncer, a idéia de utilizarmos ensaios com linfócitos de sangue periférico, o qual nos forneça o nível de toxicidade de uma droga, bem como a capacidade de reparo de lesões no DNA dessas células, favorece a utilização desses ensaios para fins de diagnóstico e prognóstico, podendo fornecer um aparato para novas estratégias de tratamentos, bem como indicar novos alvos para a terapia do câncer.

## **2. Efeito da DOX em fibroblastos deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos**

Uma grande parte dos agentes antitumorais tem como alvo a molécula de DNA, sendo que a eficácia destas drogas está diretamente correlacionada com a sua capacidade de causar danos no DNA (Bonassa, 1998; Moustachi, 2000; Blasiak et. al., 2004). A doxorrubicina é um exemplo de droga que age sobre a molécula de DNA utilizada na quimioterapia de tumores. Ela é classicamente conhecida por sua ação inibitória sobre a topoisomerase II (topoII), o que impede que essa proteína religue as fitas de DNA, causando DSB (Minotti et. al., 2004). Porém, esse não é o único mecanismo de ação apresentado pela droga, sendo que esta pode formar adutos de DNA, o que acarreta uma grande ação citotóxica, induzindo a morte celular (Cutts et. al., 2005). Apesar dessa droga apresentar uma grande eficácia sobre tumores, como o de mama, um efeito colateral severo apresentado por muitos pacientes que recebem quimioterapia com DOX é a cardiotoxicidade. Esse efeito é decorrente dos radicais livres liberados pela droga, uma vez que tais espécies danificadoras atuam

preferencialmente sobre o miocárdio (Minotti et. al., 2004; Outomuro et. al., 2006). A partir do vasto mecanismo de ação apresentado pela DOX, é esperado que várias proteínas, das mais diversas vias de sinalização, estejam sendo ativadas em resposta aos danos causados no DNA por esse agente quimioterápico.

A XPD é uma proteína com função helicase (5' – 3') pertencente ao fator transcricional TFIIH, o qual participa não somente dos processos transcricionais, como também de mecanismos de reparo de danos no DNA, como o de excisão de nucleotídeos. O gene XPD apresenta algumas características muito interessantes, uma vez que ele é considerado por alguns autores como um gene e três doenças. Isto provém de mutações na sua seqüência, onde a parte mutada é fundamental para determinar a característica fenotípica apresentada pelo paciente. Mutações no gene XPD estão correlacionadas ao desenvolvimento de Xeroderma Pigmentoso (XP), Tricotiodistrofia (TTD) e uma síndrome que combina características da doença XP e da Síndrome Cockayne (XP/CS) (Lehmann, 2001; Costa et. al., 2003; Cleaver, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a proteína XPD possui um domínio ferro-enxofre, o qual parece ser essencial para a sua atividade de helicase, bem como pode explicar as características fenotípicas de várias mutações clinicamente relevantes dessa proteína (Rudolf et. al., 2006).

O NER e outros mecanismos de reparo de danos no DNA têm sido largamente estudados com o objetivo de desenvolver novos alvos moleculares para a terapia antitumoral, uma vez que os mecanismos de reparo estão diretamente correlacionados com a resistência de muitos tumores às estratégias de terapias. Componentes do NER e MMR estão envolvidos no reconhecimento e reparo de adutos de DNA induzidos por cisplatina (Madhusudan e Hickson, 2005). Nossos resultados mostraram o envolvimento do NER no reparo de lesões induzidas pela DOX, uma vez que células XPD e XP/CS apresentaram uma maior sensibilidade à droga quando comparados com as linhagens celulares TTD e MRC5 (fibroblasto normal). Estes resultados de sensibilidade estão de acordo com a sensibilidade apresentada por essas linhagens à exposição a raios UV, onde XPD apresentou a maior sensibilidade seguida pela XP/CS (Armellini et. al., 2005). Porém, em nosso estudo, a dose de DOX utilizada foi fundamental para determinar a sensibilidade das linhagens (capítulo 2, figura 1).

Nossos resultados indicam que o mecanismo de ação de DOX em células deficientes no gene XPD é acompanhado por danos no DNA, uma vez que todas as linhagens celulares apresentaram lesões detectadas pelo ensaio cometa alcalino, bem

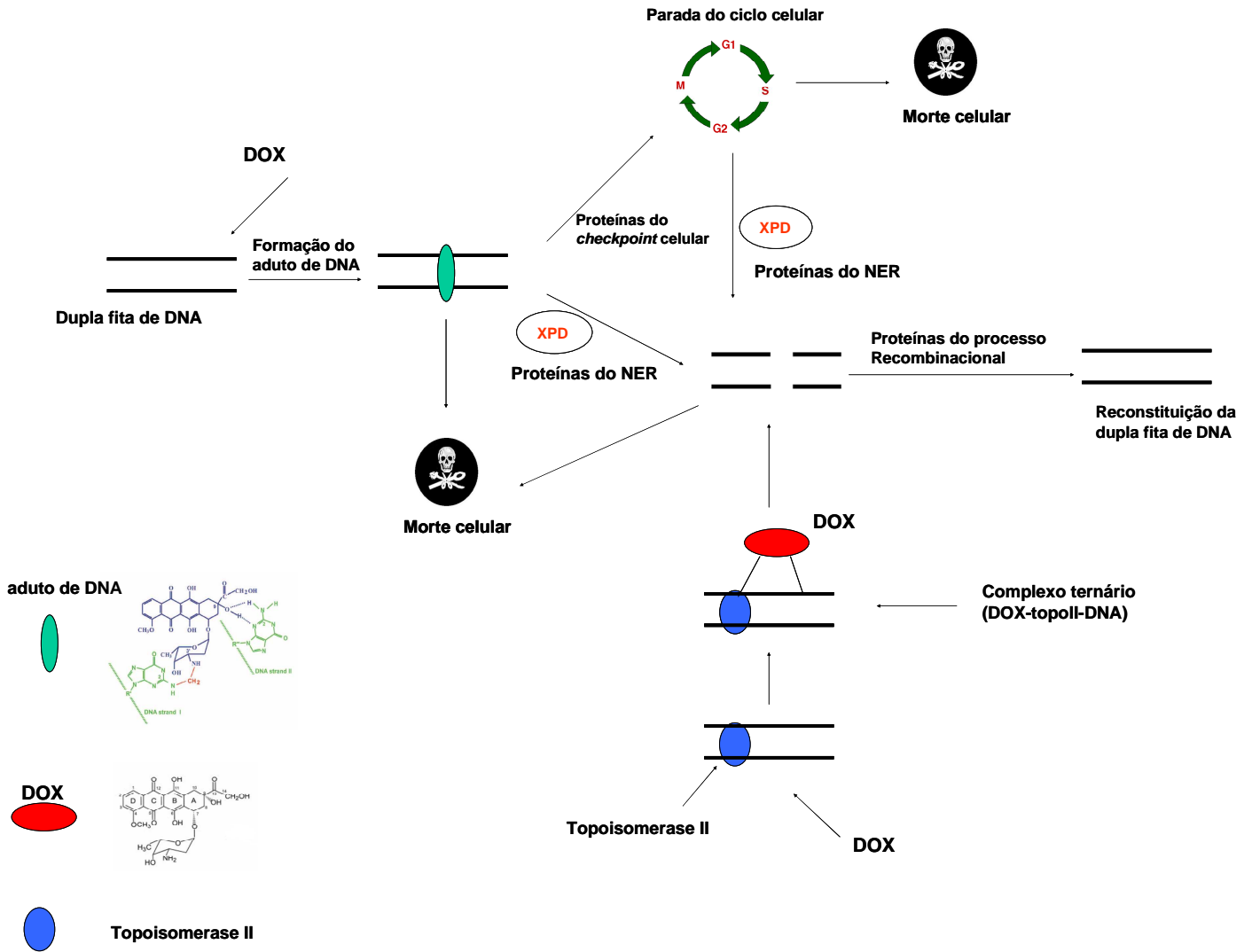
como a formação de *foci* de  $\gamma$ H2AX, um indicativo de DSB. Não foi verificada uma diminuição no escore visual de danos no DNA (ensaio cometa), após 3 horas de pós incubação sem a droga, o que indica que as linhagens não são capazes de reparar as lesões induzidas pela DOX, diferentemente do observado para o MMS. Esses resultados sugerem que os outros tipos de danos causados por DOX, os quais não foram detectados pelo ensaio cometa alcalino, como adutos de DNA, poderiam estar envolvidos nos processos de morte celular induzido por DOX nas linhagens celulares deficientes e proficientes em XPD.

Foram realizados também alguns ensaios visando determinar o envolvimento de radicais livres liberados pela DOX nos processos de morte celular nas linhagens deficientes em NER. Nossos resultados indicaram que, em uma dose baixa de DOX, não houve envolvimento de radicais livres nos processos de morte celular induzidas pela droga (figura 3, capítulo 2). Esses dados reforçam novamente a idéia de que a diferença de sensibilidade dessas linhagens celulares poderia estar sendo determinada pela formação de adutos de DNA, o que também estaria indicando um envolvimento de NER no processo de remoção dessas lesões.

Os resultados obtidos nesse trabalho, somados aos seguintes trabalhos: 1) estudos em *Drosophila Melanogaster*, que mostraram que as lesões causadas pela DOX são preferencialmente reparadas pelo processo recombinacional (Lehmann et. al., 2003); 2) ao estudo realizado em *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando o envolvimento da proteína Ssl2p (pertencente ao fator transcricional TFIIH e que participa dos processos de transcrição e de NER) na proteção contra a toxicidade da DOX (Furuchi, et. al., 2004); 3) envolvimento do NER na formação de DSB (De Silva et. al., 2000), de remoção de danos causados pela DOX, o qual está representado na figura 10. Após a formação de um aduto de DNA pela DOX, as proteínas do NER seriam recrutadas (incluindo a proteína XPD); para executarem a remoção da lesão; esse processo gera quebras no DNA, as quais canalizariam então para o processo recombinacional. Na ausência de NER o reparo desses adutos poderia ser deficitário o que levaria a morte celular. Esse modelo também se aplica a ação de DOX sobre a topoisomerase II, uma vez que essa inibição leva a formação de DSB, as quais poderiam ser reparadas diretamente pelo processo recombinacional, não sendo interferido pela ausência de proteínas do NER. Isto poderia explicar a maior sensibilidade das células mutadas em XPD a DOX, salientando a importância do local do gene mutado, uma vez que XPD e XP/CS foram mais sensíveis do que TTD e MRC5. Embora todas as



linhagens deficientes em XPD são mutadas na extremidade C-terminal do gene, apenas XP/CS é mutada em um domínio helicase (DNA/DNA e DNA/RNA) da proteína XPD (Armellini, et. al. 2004). Além disso, esse mecanismo reforça a idéia de que os adutos de DNA formados pela DOX são cruciais para a citotoxicidade celular induzida pela droga e ainda, mostra um possível envolvimento de NER na resistência de certas linhagens celulares a DOX.



**Figura 10. Modelo proposto para o mecanismo de ação da DOX.** Esse modelo desmota o possível mecanismo de reparo aos danos no DNA causados pela DOX, bem como os processos de indução a morte celular.

## VI - CONCLUSÕES

### 1. Capítulo 1

- As pacientes com câncer de mama apresentam um acúmulo significativo de danos endógenos no DNA, bem como uma deficiência ou retardo nos processos de reparo de lesões induzidas por peróxido de hidrogênio e por um agente alquilante (MMS), quando comparados com indivíduos sem tumores.
- De forma geral, não foi observada diferença significativa entre a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) das pacientes com câncer de mama e os indivíduos do grupo controle.
- Há uma correlação direta entre danos endógenos elevados no DNA e perfil antioxidante, onde as pacientes com altos níveis de danos endógenos no DNA apresentam uma baixa atividade de SOD.

### 2. Capítulo 2

- As linhagens celulares XPD e XP/CS apresentaram uma maior sensibilidade a DOX, sendo que a dose foi fundamental para determinar a sensibilidade dessas linhagens.
- Todas as linhagens celulares, exceto XPD, apresentaram parada em G2 após tratamento com a menor dose de DOX (0,2 µg/mL).
- Na dose de 0,6 µg/mL todas as linhagens celulares estudadas apresentaram um aumento nos níveis de apoptose, o que acarretou um não bloqueio do ciclo celular em G2.
- Não foi observado participação de radicais livres liberados pela DOX na dose de 0,2 µg/mL, nos processos de morte celular induzidos pela droga.
- DOX induziu danos significativos no DNA tanto em fibroblastos proficientes quanto deficientes em XPD na dose de 0,6 µg/mL.
- Nenhuma das linhagens celulares apresentou diminuição nos níveis de danos no DNA, após 3 horas de pós-incubação sem a droga.

- DOX induz a formação de *foci* de  $\gamma$ H2AX em todas as linhagens de maneira tempo dependente.
- As linhagens TTD e XP/CS apresentaram *foci* de  $\gamma$ H2AX em células não tratadas.

## VII - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observando o vasto aumento na incidência de câncer entre a população mundial, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, assim como a busca por novos métodos de diagnóstico e de novos alvos moleculares para o tratamento dessas doenças, nosso trabalho conseguiu fortalecer a idéia de que os linfócitos de sangue periférico podem auxiliar no monitoramento de genotoxicidade a certas drogas antitumorais, assim como reforçou a utilização de metodologias simples, como o ensaio cometa para tais fins. Além disso, os resultados apresentados nessa dissertação indicam que a proteína XPD está envolvida na remoção de danos no DNA causados pela DOX, o que poderia estar correlacionado com a resistência de certos tumores ao tratamento com DOX. Assim, nossos estudos seguem a tendência das pesquisas relacionadas com terapia antitumoral, onde se buscam novos alvos moleculares, os quais, muitas vezes, estão inseridas em mecanismos da manutenção da integridade genômica, como os mecanismos de reparo de danos no DNA.

## VIII - PERSPECTIVAS

### Capítulo I

- Verificar possíveis polimorfismos em genes relacionados ao câncer de mama, como BRCA1 e BRCA2, XPD e ERCC2.
- Acompanhar a cinética de reparo de DNA nos linfócitos das pacientes por tempos mais longos, como 12 e 24 horas.
- Verificar a expressão de algumas polimerases como pol $\beta$  e pol $\kappa$  nos linfócitos das pacientes.

### Capítulo II

- Determinar a participação de adutos de DNA, formados pela DOX, na indução de morte celular em fibroblastos deficientes em XPD e em outros genes da via NER.
- Determinar a participação do processo replicacional da indução de morte celular induzida pela DOX nos fibroblastos deficientes e proficientes em NER.
- Verificar a presença de danos oxidativos nessas linhagens de fibroblastos após o tratamento com DOX.
- Testar a sensibilidade de linhagens deficientes em mecanismos de reparo a outros agentes quimioterápicos.

**IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aas T, Geisler S, Eide GE, Haugen DF, Varhaug JE, Basso AM, Thorsen T, Berntsen H, Borresen-Dale AL, Akslen LA, Lonning PE (2003). Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*, 39: 438–446
- Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H, Gulshan S, Behbehani A, Farghally M (2002). Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients. *J Clin Lab Anal* 16:167-71
- Adams JM (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17:2481-95
- Adimoolam S, Ford JM (2003). p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair* 2:947-954
- Almeida VR, Leitão A, Reina LCB, Mountanari A e Donnici CL (2005). Câncer e Agentes Antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* 28:118-129
- Anderson E (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4:197-201
- Armellini MG, Muotri AR, Marchetto MCN, Lima-Bessa KM, Sarasin A, Menck CFM (2004). Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. *Cancer Gene Therapy* 12:389-396
- Banáth JP and Olive PL (2003). Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Research* 63:4347-4350
- Bergmann E and Egly JM (2001). Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends in Genetics* 17:279-286
- Bernard-Marty C, Lebrun F, Awada A, Piccart MJ (2006). Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer: current status and future directions. *Drugs* 66:1577-91
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, 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
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zadrozny M (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage,

- DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res* 554:39-148
- Bonassa E (1998). *Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Atheneu Ed. ISBN 85:7379-047-4
- Braithwaite AW, Royds JA and Jackson P (2005) The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 26:1161-1169
- 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
- Christmann M, Tomicic MT, Ross WP, Kaina B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34
- Clarkson SG, Wood RD (2005). Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair* 4:1068-74
- Clemons M, Goss P (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344:276-85
- Cleaver JE (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nature Reviews – Cancer* 5:564-573
- Collins AR (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26:249-261
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM (2003). The eucaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083-1099
- Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A and Phillips DR (2005). The power and potential of Doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* 57:73-81
- Daidone MG, Paradiso, A, Gion M, Harbeck N, Sweep F, Schmitt M (2004). Biomolecular features of clinical relevance in breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 31:3-14
- Dallas A, Vlassov AV (2006). RNAi: A novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit* 12:RA67-74
- De Boer J, Hoeijmakers JH (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21:453-60
- Dumitrescu RG, Cotarla I (2005). Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 9:208-221
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004). H2AX the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3:959-967



- Ford JM (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutation Research* 577:195-202
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006). DNA repair and mutagenesis. 2<sup>a</sup> ed., ASM Press EUA, 1118 p.
- Furuchi T, Takahashi T, Tanaka S, Nitta K, Naganuma A (2004). Functions of yeast helicase Sslp2 that are essential for viability are also involved in protection from the toxicity of adriamycin. *Nucleic Acids Res* 32:2578-85
- Gerber M, Richardson S, Crastes PP, Pujol H, Crastes PA (1989). Relationship between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in breast cancer. Nutritional and metabolic aspects. *Cancer* 64:2347-53
- Gewirtz DA (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-41
- Gillet LCJ and Schärer OD (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 106:253-276
- Güven M, Öztürk B, Sayal A, Özetürk A, Ulutin T (1999). Lipid peroxidation and antioxidant system in the blood of cancerous patients with metastasis. *Cancer Biochem Biophys* 17:155-162
- Hajra KM and Liu JR (2004). Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 9:691-704
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR (2003). Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 544:107-114
- Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon A and Miller MS (2002). Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicology and Applied Pharmacology* 185:64-73
- Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC (2003). Radical causes of cancer. *Nature* 3:276-284
- Karyia S, Ogawa Y, Nishioka A, Moriki T, Ohnishi T, Ito S, Murata Y, Yoshida S (2005). Relationship between hormonal receptors, HER-2, p53 protein, Bcl-2, and MIB-1 status and the antitumor effects of neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in invasive breast cancer patients. *Radiat Med* 23:189-94
- Kastan MB and Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-323

- Khanna KK and Chenevix-Trench G (2004). ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 9:247-262
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC (1994). The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* 130:1018-21
- Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, Loning T (2006). Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:159-68
- Kumaraguruparan R, Subapriya R, Kabalimoorthy J, Naginia S (2002). Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast cancer. *Clin Biochem* 35:275-9
- Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy J, Naginia S (2005). Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clinical Biochemistry* 38:54-158
- Le Page F, Voahangy R, Didier M, Jeannine C, Michel P, Jean F, Alain S (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60:5548-5552
- Lehmann AR (2001). The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15:15-23
- Lehmann M, Franco L, Vilar KSP, Reguly ML, Andrade HHR (2003). Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 539:167-175
- Lichtenstein, AV (2005). On evolutionary origin of cancer. *Cancer cell International* 5:1-9
- Liu X, Zhao J, Zheng R (2003). DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutation Research* 539:1-8
- Ma H, Bernstein L, Ross RK and Ursin G (2006). Hormone-related risk factors for breast cancer in women under age 50 years by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and case-case comparison. *Breast Cancer Research* 8:1-10
- Madhusudan S and Hickson, ID (2005). DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *TRENDS in Molecular Medicine* 11:503-511

- Malumbres M and Barbacid M (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30:630-641
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumoral Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56:185-229
- Mobley JA and Brueggemeier W (2004). Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25:3-9
- Motoyama N and Naka K (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current Opinion in Genetics & Development* 14:11-16
- Moustacchi E (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation Research* 464:35-40
- Mullan PB, Gorski JJ, Harkin DP (2006). BRCA1 – A good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochimica et Biophysica Acta. Article in press*
- O’Driscoll M and Jeggo PA (2006). The role of double-strand break repair – insights from human genetics. *Nature* 7:45-54
- O’Shaughnessy JA (2003). Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4:318-28
- Outomuro D, Grana DR, Azzato F, (2006). Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem? *Int J Cardiol Article in press*
- Oytun P, Ozay O, Mine EI, et. al. (2000). Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem* 33:279-84
- Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR (2005). DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implication in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Letters* 239:84-97
- Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegele P, Eber M, Ghnassia JP (2004). Comparative value of tumour grade hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 40: 205–211
- Prakash S, Johnson RE and Prakash L (2005). Eucaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* 74:317-53

- Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA (2000). Lipid peroxidation, free radicals production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 59:163-170
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ (2003). The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 8:307-325
- Rudolf J, Makrantonis V, Inglede WJ, Stark MJR, and White MF (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular Cell* 23:801-808
- Ruggero D and Pandolfi PP (2003). Does The ribosome translate cancer? *Nature Reviews* 3:179-191
- Saffi J, Henriques JAP (2003). Reparação de DNA em células eucarióticas. In: *Genética Toxicológica*, Silva, Juliana da; Erdtmann, Bernardo; Henriques, João Antonio Pêgas (Org.), Editora ALCANCE, 271-308
- Seker H, Butkiewicz D, Bowman ED, Rusin M, Hedayati M, Grossman L, Harris CC (2001). Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res* 61:7430-7434
- Seven A, Erbil Y, Seven R (1998). Breast cancer and benign breast disease patients evaluated in relation to oxidative stress. *Cancer Biochem Biophys* 16:333-45
- Stark A, Hulka BS, Joens S, Novotny D, Thor AD, Wold LE, Schell MJ, Melton LJ 3rd, Liu ET, Conway K (2000). HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol* 18:267-74
- Stewart ZA, Pietenpol JA (2001). p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol* 14:243-63
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR and Cutts S (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 66:4863-4871
- Tas F, Hansel H, Belce A, Ilvan S, Argon A, Camlica H and Topuz E (2005). Oxidative stress in breast cancer. *Medical Oncology* 22:11-15
- Trenz K, Rothfuss A, Schütz P, Speit G (2002). Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutation Research* 500:89-96

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ and Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266:37-56
- Vidanes GM, Bonilla CY and Toczyski DP (2005). Complicated Tails: Histone modifications and the DNA damage response. *Cell* 121:973-976
- Vousden KH (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1602:47-59
- Yeh C, Hou M, Tsai S, Lin S, Hsiao J, Huang J, Wang L, Wu S, Hou L, Ma H, Tsai L (2005). Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 361:104-111
- Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan RM (2006). Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol* 7:657-67
- Wood RD, Mitchell M, Lindahl T (2005). Human DNA repair genes, 2005. *Mutation Research* 577:275-283

[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) – Acesso em 10/09/2006

[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) – Acesso em 09/10/2006

**X - ANEXOS**