

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

GIOVANA NATIELE MACHADO ESQUISSATO

**Genotoxicidade do alcalóide camptotecina e do seu análogo irinotecan  
através do ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans* (teleomorfo  
*Emericella nidulans*)**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL - 2012

**GIOVANA NATIELE MACHADO ESQUISSATO**

**Genotoxicidade do alcalóide camptotecina e do seu análogo irinotecan  
através do ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans* (teleomorfo  
*Emericella nidulans*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marialba Avezum Alves de Castro-Prado.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL - 2012**

Aos meus pais, Maria Luciene e Hélio Esquissato, por todo zelo, compreensão, apoio, amor, carinho e dedicação. Meus amados pais, muito obrigada por me ajudarem a realizar este sonho.

Ao meu esposo, Edimar Cabral da Silva, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada por todo seu cuidado, carinho e paciência. Seu apoio, amor e compreensão foram fundamentais para essa conquista.

A todos os amigos que me apoiaram nesta caminhada.

Com amor e carinho, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre me conduziu, fortaleceu e capacitou.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora doutora Marialba Avezum Alves de Castro-Prado, minha Orientadora, pela compreensão, apoio, dedicação e ensinamentos.

A todos os professores do Programa Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

À minha Coorientadora, professora doutora Juliane Rocha de Sant'Anna, pela paciência em ensinar, pelos conselhos, por me auxiliar em todos os momentos e por ser sempre tão prestativa.

À equipe, funcionários e professores, do Departamento de Biologia Celular e Genética que contribuíram para concretização e êxito deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquiria Magro, pelo apoio indispensável.

Às minhas queridas amigas de Laboratório, Claudinéia Conattione da Silva Franco, Lucia Jacovozzi Rosada, Danielle Tolomeotti, Paula Andréia de Souza e Joana Paula de Sant'Anna, pela agradável companhia, pelos grandes favores prestados, pela maravilhosa amizade que construímos. Serei eternamente grata a essa equipe maravilhosa de trabalho e de convivência.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

GIOVANA NATIELE MACHADO ESQUISSATO, filha de Hélio Esquissato e de Maria Luciene Machado Esquissato, nasceu em 14 de outubro de 1986, na cidade de Toledo, estado do Paraná.

Em dezembro de 1996, concluiu as séries iniciais do Ensino Fundamental na Escola Municipal Regente Feijó e, no ano 2000, completou o ensino fundamental no Colégio Estadual São José, ambos os colégios da cidade de São José das Palmeiras, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 2003, no Colégio Estadual Presidente Castelo Branco (Premem), no município de Toledo, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em março de 2005, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), obtendo o título de Licenciatura em Ciências Biológicas em dezembro de 2008.

Em 2009 e início de 2010, trabalhou como pesquisadora em uma indústria farmacêutica.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, realizando estudos na área de genética de microorganismos e genotoxicidade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. <i>Aspergillus nidulans</i> e recombinação mitótica.....	4
2.2. Topoisomerases.....	6
2.3. Inibidores da topoisomerase.....	11
2.3.1. Camptotecina e irinotecan.....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Linhagens.....	17
3.2. Meios de cultura.....	19
3.2.1. Meio mínimo (MM).....	19
3.2.2. Meio completo (MC).....	20
3.2.3. Meio seletivo (SM).....	20
3.3. Concentrações dos antineoplásicos.....	20
3.4. Avaliação da citotoxicidade da CPT e do CPT – 11.....	21
3.5. Obtenção dos diplóides tratados com CPT e CPT - 11 e seleção dos segregantes haplóides.....	21
3.6. Determinação dos índices de homozigotização.....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genótipo e origem das linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	19
Quadro 2 - Índice de homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, cultivado em MM e MM + NaOH 10%.....	27
Quadro 3 - Índice de homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, após tratamento com 3,5 ng mL <sup>-1</sup> , (D6 – D8), 10,5 ng mL <sup>-1</sup> (D9 – D11) e 17,4 ng mL <sup>-1</sup> (D12 – D14) de camptotecina.....	32
Quadro 4 - Índice de homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, após tratamento com 4,5 µg mL <sup>-1</sup> (D15 – D17), 9 µg mL <sup>-1</sup> (D18 – D20) e 18 µg mL <sup>-1</sup> (D21 – D23) de irinotecan.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas e flores da árvore <i>Camptotheca acuminata</i> .....	2
Figura 2 - Homozigose do gene <i>Rb</i> induzido pelo <i>crossing-over</i> mitótico em uma célula heterozigota.....	6
Figura 3 - Mecanismo de ação da enzima topoisomerase I.....	8
Figura 4 - Estrutura esquemática da enzima topoisomerase I em humanos.....	8
Figura 5 - Visão geral da estrutura da topoisomerase I humana, em complexo com o DNA.....	9
Figura 6 - Estrutura da topoisomerase II.....	10
Figura 7 - Estrutura química do fármaco camptotecina e seu análogo sintético Irinotecan.....	11
Figura 8 - Processo de clivagem e religação do DNA pela topoisomerase I .....	12
Figura 9 - Estrutura química do irinotecan (CPT-11), do composto biologicamente ativo, SN -38 e do composto inativo do irinotecan.....	15
Figura 10 – Esquema do Ciclo parassexual em fungo.....	17
Figura 11 - Linhagens nutricionalmente complementares utilizadas para obter o diplóide.....	18
Figura 12 - Foto do heterocário com crescimento vigoroso, diplóide.....	18
Figura 13 - Genótipo complementar das linhagens UT448 e A 757. Posições dos marcadores nutricionais nos cromossomos I, II e IV.....	19
Figura 14 - Diplóides UT 448/A757 cultivado em MM + CPT e MM + CPT-11, nas concentrações de 3,5 ng mL <sup>-1</sup> e 18 µg mL <sup>-1</sup> respectivamente.....	22
Figura 15 – Etapas necessárias para obtenção de segregantes haplóides.....	23
Figura 16 - Análise fenotípica dos segregantes haplóides. Cada placa mestra é replicada para diferentes tipos de meio de cultura.....	24
Figura 17 - Origem dos diplóides heterozigotos (-/+ e +/-) e homozigoto (+/+) resultantes do <i>crossing-over</i> mitótico entre o gene <i>paba</i> e o centrômero.....	25
Figura 18 – Crescimento do diplóide UT448//A757 em meio completo (MC) e em MC + CPT (17,4 ng mL <sup>-1</sup> , 10,5 ng mL <sup>-1</sup> , 3,5 ng mL <sup>-1</sup> ),.....	26
Figura 19 - Crescimento do diplóide UT448//A757 em meio completo (MC) e em MC + CPT-11 (18 µg mL <sup>-1</sup> , 9 µg mL <sup>-1</sup> e 4,5 µg mL <sup>-1</sup> ).....	28



## RESUMO

ESQUISSATO, Giovana Natiele Machado, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2012. **Genotoxicidade do alcalóide camptotecina e do seu análogo irinotecan através do ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans* (teleomorfo *Emericella nidulans*)**. Orientadora: Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Coorientadora: Juliane Rocha de Sant'Anna.

A recombinação mitótica é um processo com participação na carcinogênese e com capacidade de induzir a perda da heterozigosidade (LOH, *loss of heterozygosity*), quando as cromátides recombinantes segregam na mitose, para diferentes células-filhas. Os potenciais recombinagênicos de dois compostos antineoplásicos, previamente caracterizados como inibidores da enzima DNA-Topoisomerase I, camptotecina (CPT) e irinotecan (CPT-11), foram avaliados no presente estudo. O ensaio de homozigotização, que permite identificar a indução da recombinação mitótica e de homozigose em células heterozigotas, bem como uma linhagem diplóide de *Aspergillus nidulans*, denominada UT448//A757, heterozigota para diferentes marcadores nutricionais e de coloração de conídios, foram utilizados para atingir os objetivos propostos. Três concentrações não-citotóxicas de CPT ( $3.5 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $10.5 \text{ ng ml}^{-1}$  and  $17.4 \text{ ng ml}^{-1}$ ) foram estudadas, as quais induziram tanto recombinação mitótica no diplóide UT448//A757, quanto homozigose de marcadores nutricionais e de coloração de conídios. Índices de Homozigotização (HI) significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes do controle negativo foram obtidos em todas as concentrações de CPT utilizadas. Dentre as três concentrações de CPT-11 utilizadas ( $18 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $9 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $4,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ), apenas a maior delas, correspondente à dose única máxima utilizada em protocolos de quimioterapia, produziu valores de HI significativamente diferentes do controle negativo. Os efeitos recombinagênicos de ambos bloqueadores de Topoisomerase I foram associados ao reparo recombinacional de quebras no DNA, induzidas pelos compostos CPT e CPT-11.

Palavras-chave: Antineoplásicos, *crossing-over* mitótico, malignidades secundárias, *Aspergillus nidulans*.

## ABSTRACT

**ESQUISSATO**, Giovana Natiele Machado, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, March de 2012. **Genotoxicity of the alkaloid camptothecin analog irinotecan and its through the parasexual cycle in *Aspergillus nidulans***. Adviser: Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Committee Member: Juliane Rocha de Sant'Anna.

Mitotic recombination is an important mechanism involved in carcinogenesis which can lead to genetic loss by LOH, when the recombinant sister chromatids segregate in mitosis to different daughter cells. The recombinogenic potential of two antineoplastic agents, previously characterized as DNA-topoisomerase I inhibitors, camptothecin (CPT) and irinotecan (CPT-11), was evaluated in the present study. The homozygotization assay, which assess the induction of mitotic recombination and gene homozygosis, as well as the heterozygous A757//UT448 diploid strain of *Aspergillus nidulans* were employed. Three non-cytotoxic concentrations of CPT (3.5 ng ml<sup>-1</sup>, 10.5 ng ml<sup>-1</sup> and 17.4 ng ml<sup>-1</sup>) were found to induce both mitotic recombination and gene homozygosis in treated *A. nidulans* diploid cells. CPT treatment produced three diploids homozygous, for nutritional and conidia color genes, and Homozygotization Indices (HI) significantly (p<0.05) different from negative control. On the other hand, with concentrations of CPT-11 (18 µg ml<sup>-1</sup>, 9 µg ml<sup>-1</sup> e 4,5 µg ml<sup>-1</sup>) only the highest CPT-11 concentration tested, corresponding to the maximal single chemotherapeutic dose, produced HI values higher than 2.0 and significantly different from negative control HI values. The recombinogenic effects of both topoisomerase I blockers were associated with the recombinational repair of DNA strand breaks induced by CPT and CPT-11.

Key words: Antineoplastic, *mitotic crossing-over*, secondary malignances, *Aspergillus nidulans*.

## 1. INTRODUÇÃO

O ser humano, assim como os demais animais e as plantas, são frutos da interação entre o genoma com o seu ambiente. A capacidade de um organismo interagir com o meio ambiente está contida no DNA. Desta interação, entretanto, podem surgir mudanças no material genético (Erdtmann et al., 2003). Os fármacos são algumas das substâncias que podem interagir com as moléculas do DNA humano e produzir efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos (Ribeiro e Marques, 2003).

Os compostos químicos que interagem e causam danos ao DNA são caracterizados como agentes mutagênicos (Ribeiro e Marques, 2003), pois podem induzir alterações na sequência de bases do DNA, elevando a frequência de mutações, algumas delas associadas ao desenvolvimento de neoplasias (Antunes e Araújo, 2000).

O estudo do potencial mutagênico e carcinogênico de fármacos ou de compostos químicos é uma das exigências dos órgãos governamentais que controlam, monitoram e regularizam o desenvolvimento de novos medicamentos e novos produtos químicos, antes que esses sejam introduzidos no mercado (Kolling et al., 2006; Brambilla e Martelli, 2009). No Brasil, o órgão governamental que promove o controle da liberação para comercialização de compostos industrializados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Esta agência possui um manual que orienta as indústrias farmacêuticas, que desenvolvem novos medicamentos, quanto à realização de estudos de genotoxicidade. Esses estudos são necessários e obrigatórios para aprovação e liberação desses medicamentos para a comercialização (Anvisa, 2010).

A camptotecina (CPT) é um alcalóide obtido da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa encontrada na região sul da China (Ferreira e Lemos-Senna, 2007) (Figura 1). Este fármaco apresenta elevada atividade antitumoral, cujo mecanismo envolve a inibição da topoisomerase I, uma enzima altamente expressa em células tumorais. A utilização deste fármaco em protocolos de quimioterapia foi, entretanto, limitada durante muitos anos, em virtude de sua toxicidade e elevada instabilidade em meio fisiológico (Granada et al., 2007).

Considerada uma droga citotóxica, a CPT é um potente inibidor da síntese de ácidos nucleicos e indutor de quebras em fitas simples no DNA de mamíferos (Hsiang et al., 1985).



Figura 1 - Folhas e flores da árvore *Camptotheca acuminata*. (Trompenburg, 2012).

O análogo semi-sintético da CPT, irinotecan ([4 - (1-piperidino)-1-piperidino] 7-etil-10 carbonyloxycamptothecin; CPT-11), caracterizado como um dos mais importantes agentes anticancerígenos desenvolvidos nas últimas décadas, apresenta melhor solubilidade em soluções aquosas e menor toxicidade quando comparado com a CPT (Kaneda et al., 1990).

A citotoxicidade do CPT-11 resulta do mesmo mecanismo de ação da CPT, ou seja, ambos os compostos mantêm estável o complexo ternário fármaco – enzima - DNA. Este complexo impede a restauração da fita simples de DNA, clivada pela topoisomerase I. Este processo induz a parada do ciclo celular em S/G<sub>2</sub>, causando a morte das células. Para que o CPT-11 e a CPT exerçam seus efeitos genotóxicos, é necessário que a síntese de DNA esteja em andamento, indicando

que a citotoxicidade destes fármacos é dependente da fase S do ciclo celular (Takimoto et al., 1998).

Considerando-se que a indução de quebras na molécula de DNA pode desencadear o processo de recombinação gênica entre cromátides homólogas e que a recombinação somática pode atuar como um mecanismo precursor da carcinogênese, o presente estudo teve como objetivo:

- 1) avaliar o potencial recombinagênico da CPT, bem como de seu análogo semissintético CPT-11 em células diplóides heterozigotas de *Aspergillus nidulans*,
- 2) comparar os resultados obtidos com ambos os fármacos.
- 3) Estudar o potencial recombinagênico das concentrações de CPT-11 utilizadas em protocolos de quimioterapia para tratamento de cânceres humanos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Aspergillus nidulans* e recombinação mitótica

O genoma do ascomiceto *Emericella nidulans* (anamorfo *Aspergillus nidulans*) foi totalmente sequenciado pelo Broad Institute (USA) em 2005. Este fungo é haplóide, possui 30 milhões de pares de bases e contém cerca de 9.500 genes codificadores de proteínas, localizados em oito cromossomos (Galagan et al., 2005).

*A. nidulans* é um fungo homotálico e filamentosos que se propaga por esporos sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios), os quais são uninucleados e haplóides. Apresenta uma grande versatilidade fisiológica, sendo capaz de crescer em várias condições de cultura, suportando alterações de temperatura, fontes de carbono, osmolaridade, força iônica e pH (Rossi e Arst, 1990). Este fungo possui ainda um ciclo de vida curto e exigências nutricionais simples, fatores que facilitam o estudo e a compreensão dos mecanismos genéticos que envolvem respostas às condições ambientais, bem como suas implicações fisiológicas e estruturais (Segato e Rossi, 2008).

Além do ciclo sexual, ou ascosporogênese, e assexual, ou conidiogênese, *A. nidulans* possui também o ciclo parassexual descrito por Pontecorvo e Kafer, (1958). O ciclo sexual e o ciclo parassexual apresentam várias características em comum: ambos envolvem fusão nuclear, recombinação entre genes ligados e não ligados e redução para haploidia (Azevedo, 1998).

O ponto inicial do processo parassexual é a heterocariose, que pode ocorrer em virtude da anastomose entre células vegetativas de linhagens geneticamente diferentes. Após a heterocariose, ocorre a fusão de núcleos, originando diplóides heterozigotos, com dezesseis cromossomos. O próximo passo é a produção de recombinantes, que envolve permuta gênica. Este diplóide pode voltar ao estado haplóide por meio de divisões mitóticas sucessivas, onde uma série de não-disjunções mitóticas pode ocorrer, levando o núcleo diplóide à haploidização. Os conídios, agora haplóides, podem germinar e dar origem a colônias geneticamente diferentes dos parentais, se eventos de permuta mitótica ocorrerem antes da haploidização (Azevedo, 1998; Segato e Rossi, 2008).

*A. nidulans* é considerado um organismo modelo para estudos genéticos. Linhagens mutantes deste fungo podem ser obtidas facilmente, diferindo das

linhagens selvagens quanto à morfologia da colônia, cor do conídio, morfologia dos conidióforos, requerimentos nutricionais e capacidade de crescer em várias fontes de carbono, havendo, ainda, mutantes resistentes a compostos fungicidas, como o benomil e acriflavina (Galagan et al., 2005).

Por estar biologicamente caracterizado, o fungo *A. nidulans* pode ser utilizado como instrumento para clonar genes de outros fungos que não estão caracterizados geneticamente (Segato e Rossi, 2008), além de ser um modelo biológico conveniente para estudos de fisiologia celular, controle do ciclo celular, estrutura da cromatina, reparo do DNA, genotoxicidade de compostos químicos e de resistência a drogas (Galagan et al., 2005). É também considerado um excelente organismo para conduzir estudos de recombinação, pois passa a maior parte de seu ciclo celular em G2. Nesta fase, os cromossomos apresentam-se duplicados, o que favorece significativamente o evento de recombinação mitótica (Bergen e Morris, 1983).

O *crossing-over* mitótico foi descrito, inicialmente, em *Drosophila melanogaster* (Stern, 1936), sendo, atualmente, considerado um processo de ampla atuação em células diplóides, com importante função na promoção de neoplasias, em células heterozigotas (Beumer et al., 1998).

A segregação de uma cromátide paternal e uma recombinante para o mesmo pólo mitótico, após um evento de recombinação mitótica em uma célula diplóide heterozigota, pode resultar na homozigose de todos os genes localizados em posição distal ao ponto de permuta. Tal homozigose pode ter efeito carcinogênico pela redução da heterozigosidade constitucional de genes supressores de tumor (Figura 2). Desta forma, substâncias que induzem quebras no DNA, ou que inibem sua replicação, podem estimular a recombinação mitótica (Zimmermann et al., 1966).

Considerando-se que o processo mitótico em *A. nidulans* assemelha-se à mitose de eucariotos (Osman et al., 1993) e que a recombinação mitótica pode estar envolvida em diferentes fenômenos biológicos (Müller e Scott, 1992), este fungo pode também atuar como ferramenta importante na caracterização do potencial recombinagênico de substâncias químicas.

A recombinação mitótica foi associada à carcinogênese, através da perda do alelo funcional de um gene supressor de tumor, em uma célula heterozigota (Cavenee et al., 1991; Marshall, 1991). A exposição de células eucariotas a

compostos recombinagênicos pode, portanto, resultar na transformação destas em clones de células neoplásicas. Estas observações destacam a importância de se avaliar o potencial recombinagênico tanto de fármacos já comercializados quanto daqueles recém sintetizados (Marshall, 1991).

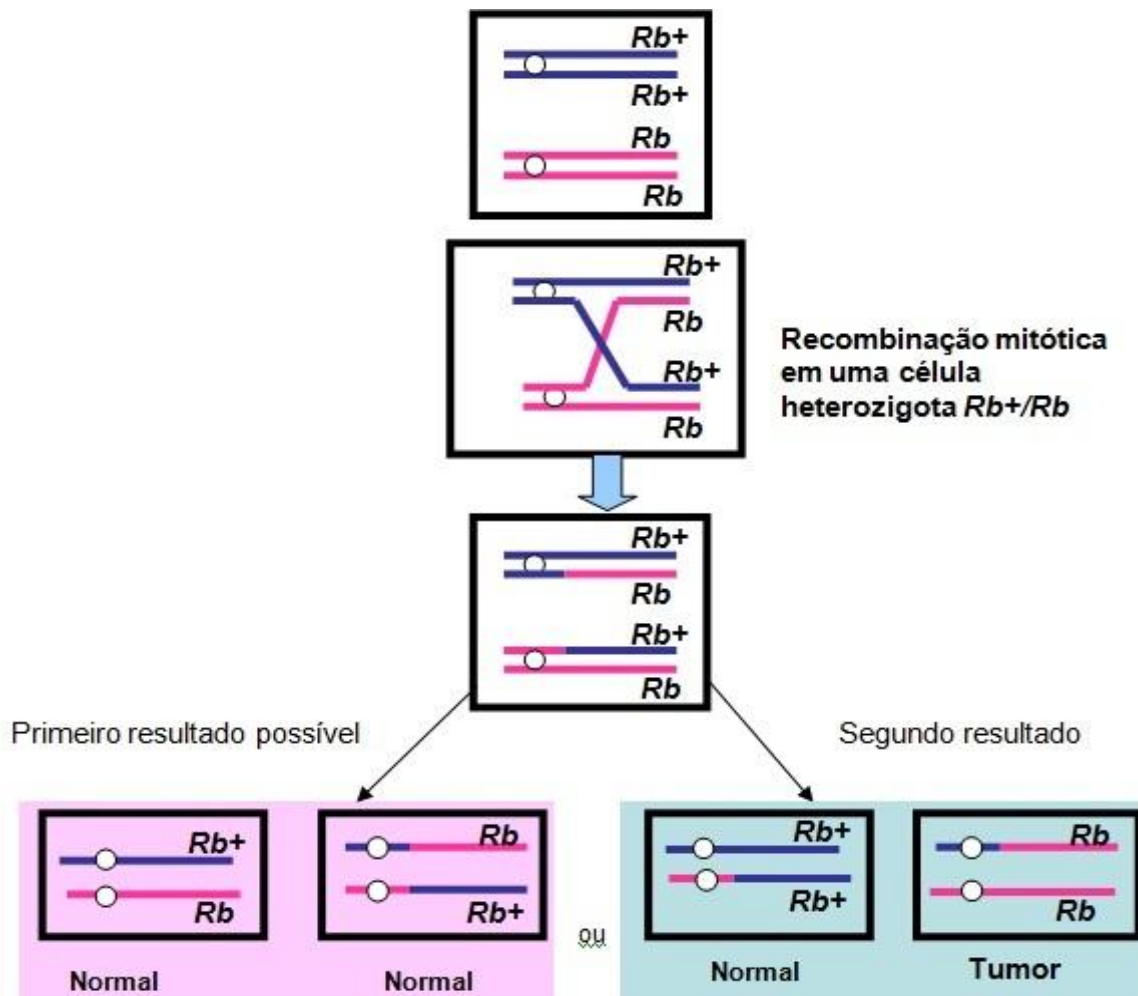


Figura 2 - Homozigose do gene  $Rb$  induzido pelo *crossing-over* mitótico em uma célula heterozigota ( $Rb^+/Rb$ ).

## 2.2. Topoisomerases

O DNA é o alvo mais importante de muitos fármacos antineoplásicos, tais como actinomicina D e adriamicina, dentre outros, com capacidade de se intercalar entre as bases do DNA, bloqueando a transcrição e a replicação. As enzimas DNA topoisomerases constituem alvos alternativos para fármacos com potencial anticancerígeno, pois tais enzimas participam de processos celulares vitais, como a replicação do DNA. As topoisomerases cortam transitoriamente uma ou ambas as cadeias do DNA e permitem resolver vários problemas topológicos do DNA, como o



super enovelamento gerado durante a replicação do DNA, no momento em que a enzima Helicase promove abertura da dupla hélice de DNA (Wang, 1996; Alberts et al., 2002).

As enzimas topoisomerases foram descobertas no início dos anos 70, mas foram estudadas, nos anos 80, quando se verificou que a enzima topoisomerase I era o único alvo molecular da CPT (Hsiang et al., 1985).

Estudos sobre o mecanismo de catálise das DNA topoisomerases conduziram à classificação destas enzimas em topoisomerase I, exemplificado pela topoisomerase de *Escherichia coli* e pelas topoisomerases eucarióticas I, e as DNA topoisomerases II, exemplificado pela DNA girase de *E. Coli* e pela DNA topoisomerase II eucariótica (Pommier et al. 2010).

O mecanismo de ação da topoisomerase I (topo I) envolve um ataque nucleofílico na ligação fosfodiéster por um resíduo de tirosina catalítica da enzima, que culmina na formação de uma ligação covalente entre a enzima e um grupo fosfato da fita clivada do DNA. Desta forma, a topo I conserva a energia do rompimento da ligação fosfodiéster, para em seguida, utilizar essa mesma energia para restaurar a ligação fosfodiéster e selar a quebra (Stewart et al., 1998) (Figura 3).

A topo I foi ainda subdividida em dois grupos, as topo I do tipo IA e as topo I do tipo IB. As primeiras, topo I do tipo IA, clivam a fita do DNA através de uma ligação covalente com a extremidade 5' da fita de DNA clivada. Em humanos, a topo I do tipo IA é exemplificada pela topo III $\alpha$  e topo III $\beta$ . A topo I do tipo IB liga-se covalentemente à extremidade 3' da fita de DNA clivada e é exemplificada pela enzima topo I do tipo IB humana nuclear e humana mitocondrial (Wang, 1996; Zhang et al., 2001; 2004).

A topo I resolve problemas topológicos associados à replicação e à transcrição do DNA, relaxando o superespiralamento gerado nestes processos (Champoux, 2001; Wang, 2009). Esta enzima é composta de aproximadamente 765 resíduos de aminoácidos, dividida em quatro domínios: o domínio amino (NH<sub>2</sub>) – terminal (geralmente corresponde aos os resíduos aminoácidos 1 a 197), o domínio nuclear (resíduos de 198 a 651), dividido nos subdomínios I, II e III; o domínio vinculador (resíduos de 652 a 696); e o domínio carboxi (COOH) – terminal (resíduos de 713 a 765), altamente conservado, onde se encontra o sítio ativo da enzima,

responsável por mediar a clivagem do DNA, a tirosina catalítica na posição 723 (Stewart et al., 1997) (Figuras 4 e 5).

As estruturas de interações covalentes e não covalentes do complexo binário DNA - topo I- foram estudadas por Stewart et al. (1997) e por Redinbo et al. (2000). Nestes estudos, observou-se que *in vitro* os domínios NH2 - terminal e vinculador, quando excluídos, não interferiam com a atividade enzimática da topoisomerase. Como o sítio ativo da enzima encontra-se no domínio COOH – terminal, estes estudos sugerem que a combinação do domínio nuclear com o domínio COOH – terminal seja suficiente para a atividade da enzima topo I.

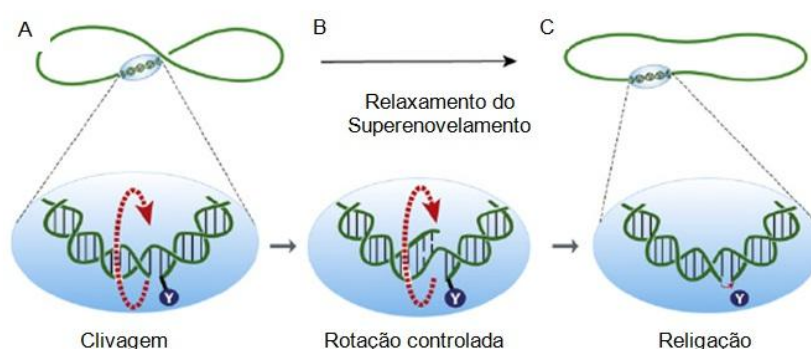


Figura 3 - Mecanismo de ação da enzima topo I. A) Sítio ativo da enzima topo I (y), que realiza a clivagem de uma ligação fosfodiéster na fita de DNA. B) A fita de DNA clivada gira, removendo a superespiração. C) A ligação fosfodiéster é restabelecida pela enzima topo I (Pommier et al., 2010).

Em função de seu papel crucial na manutenção da replicação do DNA, a enzima topo I tornou-se um alvo promissor para o tratamento de neoplasias (Khadka e Cho, 2011; Thapa et al., 2011).

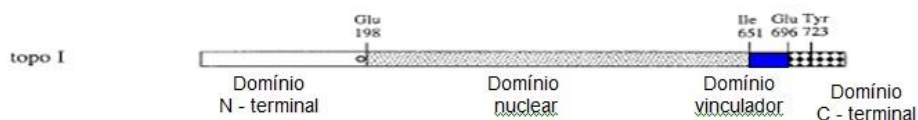


Figura 4 - Estrutura esquemática da enzima topo I de 91 KDa, em humanos. Em branco o domínio NH2 - terminal, em pontilhado o domínio nuclear, em azul o domínio vinculador e em xadrez o domínio COOH – terminal (modificado de Stewart et al., 1997).

Outras enzimas envolvidas no processo de duplicação do DNA são as topoisomerases II (topo II). Estas enzimas também foram subdivididas em topo II do tipo II $\alpha$  e topo II do tipo II $\beta$ . Ambas produzem quebras nas duas fitas do DNA, prendem-se às extremidades 5' da fita clivada de DNA e através de ligações covalentes, passam a dupla fita através do corte e selam a quebra. A enzima topo II pode introduzir ou relaxar o superespiralamento da molécula do DNA, através de um mecanismo dependente de ATP, participando de outros processos celulares importantes, tais como recombinação, reparo do DNA e transcrição (Sugino et al., 1980; Wang, 2002) (Figura 6).

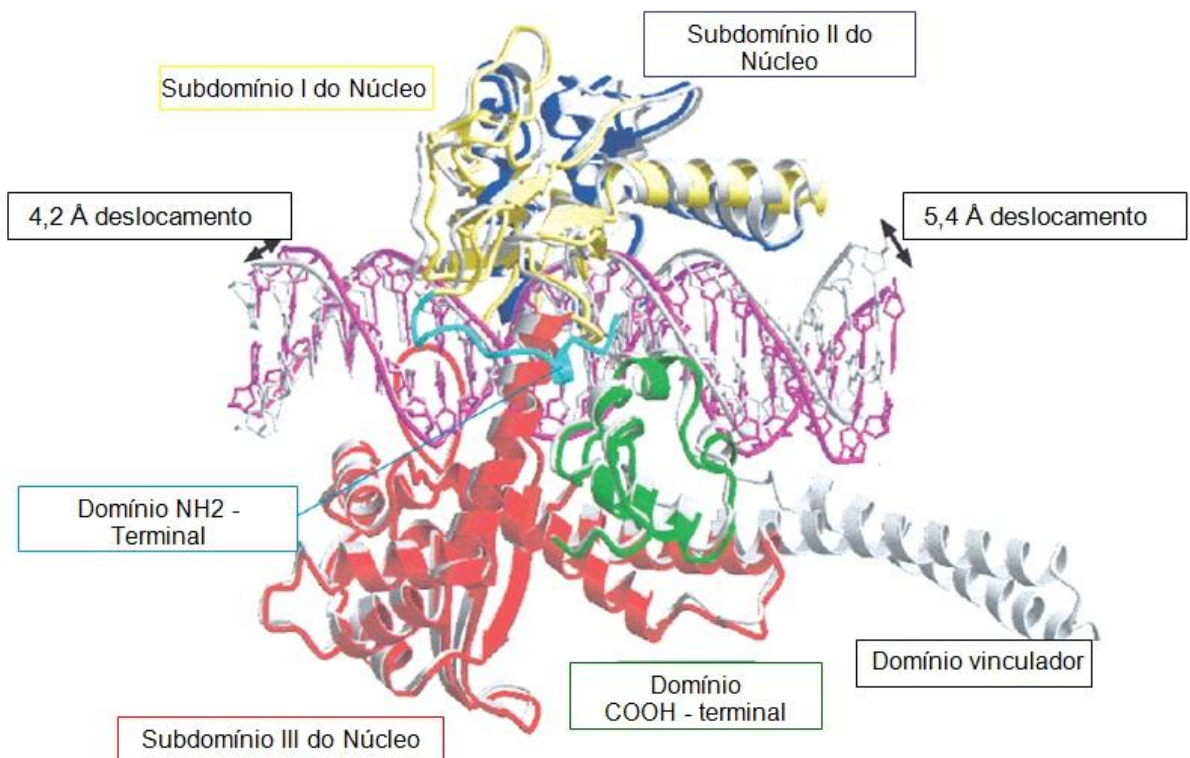


Figura 5 - Visão geral da estrutura da topoisomerase I humana, em um complexo com o DNA. Em verde o domínio COOH-terminal, em amarelo, azul e vermelho, os subdomínios I-III do núcleo, em azul o domínio NH2-terminal (Redinbo et al., 2000).

As topo II também são alvos de medicamentos antineoplásicos, os quais são conhecidos como venenos de topoisomerase II, e atuam pelo aumento da concentração de complexos covalentes DNA - enzima. Como resultado, esses agentes antineoplásicos geram altos níveis de quebra no DNA e finalmente, desencadeiam apoptose celular (Fortune e Osherooff, 2000).

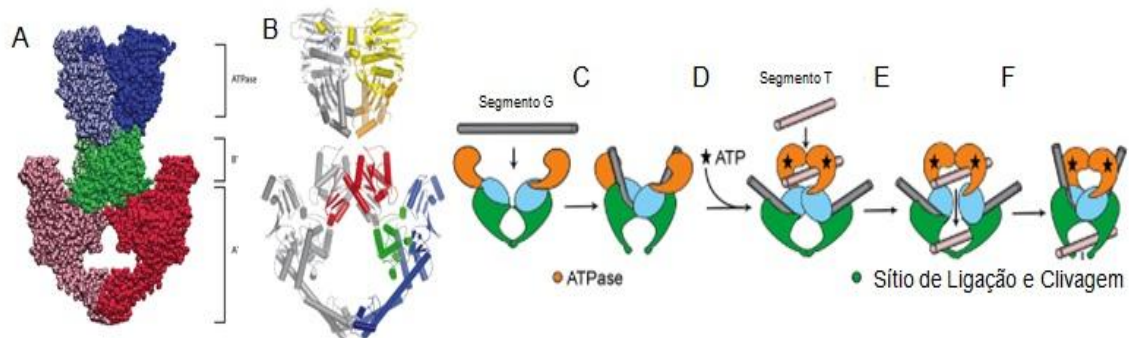


Figura 6 - A e B) Estrutura da topo II. C) o sítio ATPase (laranjado) se abre para receber um DNA duplex, o segmento G, que é transportado ao núcleo da enzima (azul), onde é dobrado. D) A admissão do segundo duplex de DNA, o segmento T, consome adenosina trifosfato (ATP). E) A admissão do segmento T, faz com que o segmento G seja clivado pelo sítio de clivagem e ligação (verde). O segmento T é transportado para o sítio de ligação e clivagem através da clivagem feita no segmento G. F) o segmento T é liberado e faz com que o segmento G se restabeleça (A Collins et al., 2009, B, C, D, E, F, modificado de Corbett e Berger, 2004).

Embora a inibição das enzimas topo I e topo II não eleve a frequência de mutação em ensaios com procaríotos, todas são potentes agentes clastogênicos e aneugênicos (Kikuchi e Pinto, 2005), capazes de induzir aneugenicidade tanto na segregação cromossômica mitótica quanto meiótica, além de neoplasias secundárias (Attia et al., 2009). Os estudos de Ferguson e Denny (1995) e Hengstler et al. (2002) demonstraram que os venenos de topo II induzem a aberrações cromossômicas, quebras no DNA e leucemias com latência mais curta (dois a três anos) que a leucemia induzida por compostos alquilantes, tais como a cisplatina e as mostardas nitrogenadas, como a ciclofosfamida. Estudos alarmantes foram publicados, sugerindo que a exposição materna a baixas doses de venenos de topo II pode contribuir para o desenvolvimento de leucemia infantil (Ferguson e Denny, 1995; Hengstler et al., 2002).

A topoisomerase eucariótica humana descoberta mais recentemente foi a topo I mitocondrial (*Top Imt*). Sendo assim, as células humanas expressam seis genes para as topoisomerasas: quatro genes para as topo I [*Top IIIα*, *Top IIIβ* (ambas do tipo IA), *Top I* e *Top Imt* (ambas do tipo IB)] e dois genes para as topo II (*Top IIα* e *Top IIβ*) (Zhang et al., 2001; 2004).

### 2.3. Inibidores da topoisomerase

Os compostos que atuam inibindo as enzimas topoisomerasas são divididos em duas classes: (1) inibidores que estabilizam o complexo enzima – DNA e impedem a etapa de restauração da ligação fosfodiéster, após o relaxamento da dupla hélice, tendo como exemplo a CPT e seus derivados; e (2) inibidores catalíticos, que inibem a atividade catalítica da enzima, como os compostos bisdioxopiperazine, probimane (Pro) e razoxane (Raz) (Boege et al. 1966).

Rhee et al. (2007) e Brunton et al. (2010) demonstraram que um dos principais requisitos estruturais de um inibidor de topoisomerase I é a presença de dois a quatro anéis aromáticos condensados (Figura 7). Substâncias com anéis aromáticos se intercalam entre os pares de base do DNA e o sítio de clivagem, impedindo a restauração da ligação fosfodiéster da fita de DNA. Na tentativa de descobrir novos inibidores da topoisomerase, diversas classes de produtos naturais têm sido estudadas nos últimos anos. Dentre estas, destacam-se os flavonóides e alcalóides (Constantinou et al., 1995).

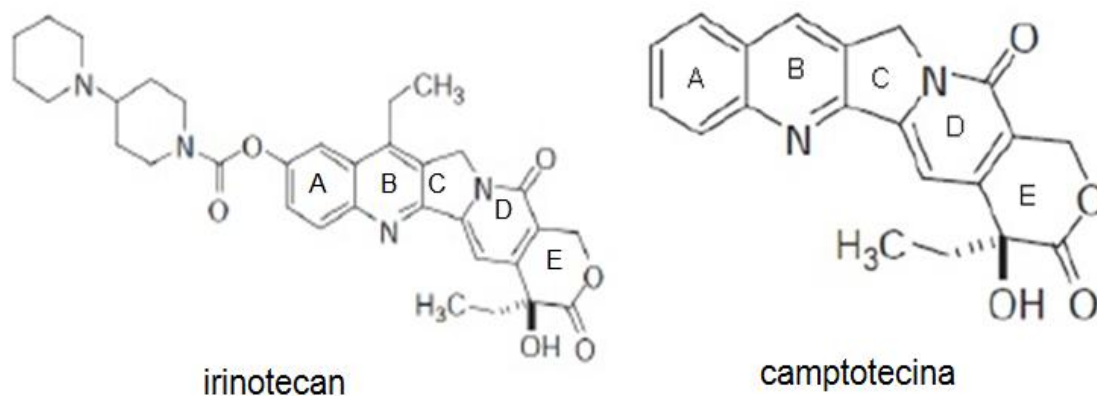


Figura 7 - Estrutura química do fármaco camptotecina e seu análogo sintético irinotecan (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>).

Descrevendo a ação destas substâncias através de uma metáfora, pode-se dizer que elas atuam como um “pé na porta” impedindo esta de fechar-se (Pommier, 2004) (Figura 8).

Descrevendo a ação destas substâncias através de uma metáfora, pode-se dizer que elas atuam como um “pé na porta” impedindo esta de fechar-se (Pommier, 2004) (Figura 8).

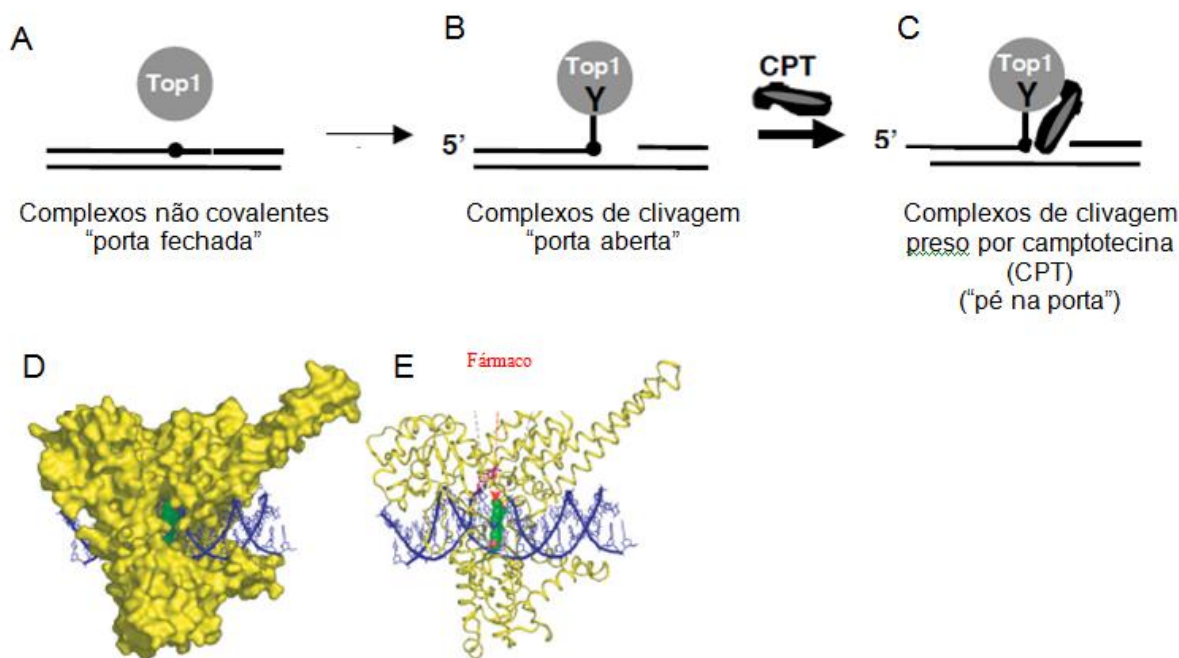


Figura 8 - Processo de clivagem e religação do DNA pela topo I. A) a tirosina catalítica (Y, posição 723 na topo I em humanos) ataca uma ligação fosfodiéster do DNA. B) esta ação gera uma ruptura ou uma "porta aberta". C) a camptotecina (o alcalóide natural ou seus derivados) impede o restabelecimento da ligação fosfodiéster pela topo I, atuando assim como um "pé na porta". A ligação da camptotecina (CPT) é não covalente e é rapidamente reversível após a remoção do fármaco. D) complexo ternário, topo I (em amarelo), DNA (fitas azuis) e CPT (verde, vermelho no meio). E) a mesma estrutura da topo I representada em fitas. (A, B, C, Pommier, 2004; D e E Modificado de Pommier, 2009).

### 2.3.1. Camptotecina e irinotecan

O agente antineoplásico CPT é obtido da árvore *Camptotheca acuminata* (Ferreira e Lemos-Senna, 2007). Este composto inibe tanto a síntese de DNA quanto de RNA (Abelson e Penman, 1972), e é seletivamente letal para as células que se encontram na fase S do ciclo celular, conforme demonstrado por D'Arpa et al. (1990) em fibroblastos de hamster chinês (V79), cultivados em presença de 10 mM de CPT. Este efeito seletivamente letal ocorre devido à fragmentação do DNA cromossômico, conforme demonstrado por Hsiang et al. (1985) por eletroforese em gel de agarose.

A citotoxicidade de drogas antitumorais, tais como CPT e CPT-11, está diretamente relacionada com a capacidade de fragmentar o DNA (Hsiang et al., 1985; Mosesso et al., 1999; Cunha et al., 2002). Tais lesões podem induzir

respostas celulares como apoptose, modulação do ciclo celular e reparo do DNA (Madhusudan e Hickson, 2005).

A atividade antitumoral da CPT foi demonstrada *in vivo* em ensaios com células leucêmicas (L1210). Neste estudo, células L1210 foram inoculadas em ratos e então o tempo de sobrevivência destes animais e a inibição do desenvolvimento da leucemia, em resposta ao fármaco, foram avaliados. Este experimento demonstrou que a CPT possui capacidade de interromper o desenvolvimento de leucemia em ratos, prolongando a vida destes, quando tratados por via intramuscular, com as concentrações de 0,25 a 1 mg/kg de CPT (Goodman e McCahren, 1966).

A avaliação farmacológica e clínica preliminar da CPT foi realizada em 1970, pelo instituto Câncer Research Center de Baltimore (EUA), com dezesseis pacientes portadores de vários tipos de tumores sólidos avançados. No intervalo de 2 a 4 semanas, os pacientes receberam 35 injeções de 0,5 a 10 mg/kg de CPT. Em alguns pacientes, houve diminuição da massa tumoral em 50%, sendo a maioria das respostas positivas, em pacientes com tumor gastrointestinal (Gottlieb e Guarino, 1970).

A CPT atua eficientemente como um inibidor da topo I em sua forma natural, o isômero 20S (Pommier, 2004). Outra característica química, necessária para o alcalóide desempenhar sua função, é a manutenção do anel lactâmico fechado (anel C, Figura 7), o que ocorre somente em pH ácido. Em pH alcalino, este anel é susceptível à hidrólise e o alcalóide deixa de exercer sua função (Pommier, 2006).

Curiosamente, os complexos de clivagem do DNA revertem em poucos minutos após a retirada da CPT do meio celular, restaurando a integridade do DNA cromossômico (Pommier, 2004). Este fenômeno incomum levou à identificação do receptor da CPT. Estudos *in vitro* de Hsiang et al. (1985) comprovaram que a DNA topoisomerase I é o unico receptor biológico da CPT. Neste mesmo estudo, o autor demonstra, através do ensaio de clivagem do DNA e por eletroforese em gel, que a CPT não interage com a topo II de mamíferos. A CPT liga-se reversivelmente aos intermediários DNA – Topo I e mantém estável o complexo ternário, CPT – Topo I – DNA. É importante ressaltar que este se fármaco liga apenas ao complexo DNA – topoisomerase e nunca a cada um separadamente, salientando ainda mais sua especificidade (Pommier, 2004).

O complexo ternário impede a restauração da fita de DNA clivada pela topo I (Takimoto et al., 1998) e, em seguida, colide com a progressão da forquilha de replicação, produzindo rupturas letais nos filamentos duplos de DNA e, eventualmente, a morte celular (Hsiang et al. 1989).

Devido à elevada toxicidade da CPT, uma série de derivados semissintéticos foram desenvolvidos, a partir deste alcalóide natural, e aprovados pela Food and Drug Administration (FDA). Estes fármacos são atualmente utilizados no tratamento clínico de diversos tipos de neoplasias. Dentre eles se destacam o topotecan (TPT) amplamente utilizado para tratar carcinoma de pulmão e de ovário (Pommier, 2009), e o CPT-11, utilizado no tratamento de carcinomas colo-retal e como segunda linha em carcinomas de ovário (Takimoto et al., 1998).

O CPT-11 é um análogo semissintético da CPT, que possui o mesmo mecanismo de ação desta (Hsiang et al., 1985; Garcia-Carbonero e Supko, 2002). Este análogo sofre uma conversão enzimática por uma enzima classificada como hidrolase, a carboxilesterase, (Garcia-Carbonero e Supko, 2002), que catalisa a hidrólise deste fármaco e a formação de ésteres (Lisboa et al., 2002). Esta enzima, que se encontra predominantemente no fígado e no intestino do paciente, embora alguns estudos também tenham demonstrado a presença de enzimas do tipo esterase no soro humano, tem como função hidrolisar a pró - droga CPT-11 para o metabólito biologicamente ativo 7-etil-10-hidroxicamptotecin (SN-38) (Kawato et al. 1991; Luo et al., 2002).

Embora apenas 2 a 5% da concentração injetada de CPT-11 sejam convertidas no composto ativo (SN-38) (O'Reilly e Rowinsky, 1996), este, por sua vez, é mil vezes mais potente em inibir a topo I que a pró-droga CPT-11 (Kawato et al., 1991). Após a hidrólise do CPT-11, o composto SN-38 é novamente submetido à glucuronidação hepática pela enzima UDP-glucuronosiltransferase, transformando-se no composto inativo SN-38 glicuronídeo (SN-38G), que sofre principalmente eliminação biliar (Mathijssen et al., 2001) (Figura 10).

O metabólito SN-38 é, portanto, mais potente em interagir e inibir a topoisomerase I do que o CPT-11 (Kawato et al., 1991), sendo também mais citotóxico contra células tumorais *in vitro* (Kaneda et al., 1990). No entanto, de acordo com Kunimoto et al. (1987), este metabólito é menos eficaz que o CPT-11, quando administrado diretamente *in vivo*.



O CPT-11 é indicado, como agente único ou em combinação com outros fármacos, no tratamento de carcinoma metastático do cólon ou reto, neoplasia pulmonar, de colo de útero, de ovário e neoplasia gástrica. É indicado como agente antineoplásico único para pacientes com neoplasia de mama e linfoma maligno. As doses aprovadas pelo FDA são de  $150 \text{ mg m}^{-2}$  de CPT-11, infundida por via intravenosa durante 90 minutos por semana, durante quatro em cada seis semanas (Rothenberg et al., 1993). Na Europa, são três infusões por semana de  $350 \text{ mg m}^{-2}$  (Dancey e Eisenhauer, 1996) sendo que a dose única máxima recomendada é de  $700 \text{ mg m}^{-2}$  (Kašuba et al., 2010).

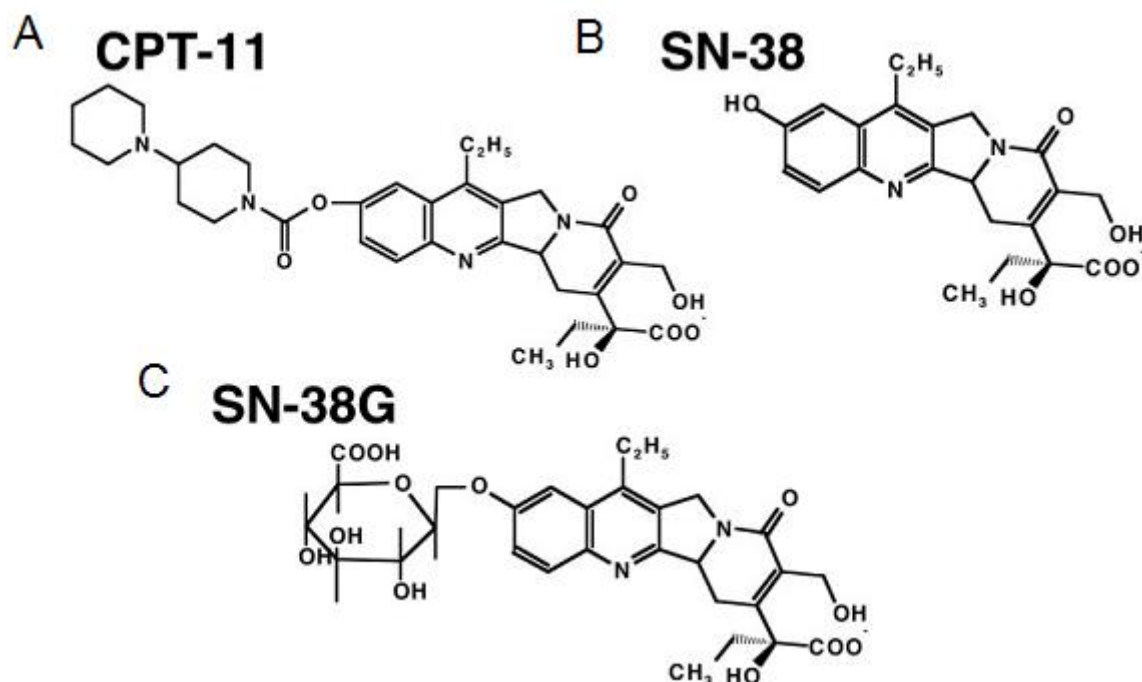


Figura 9 - A) estrutura química do irinotecan (CPT-11). B) estrutura química do composto biologicamente ativo, SN -38. C) Composto inativo (Nozawa et al., 2005).

Os efeitos adversos do CPT-11, observados em estudos clínicos, são mielossupressão, septicemia neutropênica sem febre, obstrução de intestino delgado, acúmulo de fluido, estomatite, náusea, vômitos, diarreia e desidratação. Há também a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis, tais como diarreia e neutropenia, até 8 horas após a administração do fármaco (Pfizer, 2004).

Estudos anteriores demonstram que o CPT-11 é mais estável em meio fisiológico (Wang et al., 1998), tem melhor solubilidade (Kaneda et al., 1990) e causa menos efeitos colaterais que a CPT, sendo também menos citotóxico. Este fármaco

forma complexos ternários DNA – topo I – CPT-11 mais estáveis que a CPT (Wang et al., 1998). Conseqüentemente, este diferencial de ação pode não somente influenciar na formação de quebras em fitas simples de DNA durante a replicação, como também induzir uma alta genotoxicidade e morte celular (Cunha et al. 2002; Attia et al. 2009).

A utilização de fármacos citotóxicos, que podem ou inibir o crescimento celular ou induzir apoptose, no tratamento de diferentes tipos de neoplasias, teve início na década de 1950, elevando a sobrevivência de pacientes com câncer. Apesar da eficácia deste tipo de tratamento, não há como negar o trauma dos sintomas decorrentes da citotoxicidade dos agentes antineoplásicos, nos pacientes tratados com quimioterapia. É bem conhecido o aumento na frequência de neoplasias secundárias após a quimioterapia, porém, menos documentadas são as “sequelas mutagênicas” induzidas pelos quimioterápicos, as quais abrangem desde pequenas alterações na fertilidade, até neoplasias ou malformações congênitas em crianças de pais com histórico de câncer (Kikuchi e Pinto, 2005).

Informações sobre a mutagenicidade de agentes antineoplásicos, fármacos e compostos químicos em geral encontram-se dispersas na literatura científica e, muitas vezes, são de difícil acesso (Kikuchi e Pinto, 2005). Poucos estudos relatam os efeitos dos compostos citados, em células germinativas. Tais estudos seriam importantes na avaliação da transmissão de danos genéticos para a geração seguinte, o que poderia levar a um aumento no risco de doenças genéticas ou câncer em crianças de pais sobreviventes destas mesmas doenças (Robbins, 1996).

Os avanços científicos direcionados ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos têm melhorado sobremaneira o prognóstico de pacientes com câncer. Entretanto, o surgimento de neoplasias secundárias nestes pacientes, relacionadas com o tratamento quimioterápico, destaca tanto o potencial genotóxico das drogas anticancerígenas, quanto a necessidade de monitoramento contínuo de pacientes tratados com tais agentes, no sentido de se detectar precocemente cânceres secundários (Yamada et al. 1999, Swerdlow et al, 2011; Roy e Eastmond, 2011).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens

Para obtenção do diplóide UT448//A757, seguiu-se metodologia descrita por Roper (1952) (Figura 10 e 12), cuja técnica consiste em coletar a massa micelial, obtida a partir da heterocariose, com o auxílio de alça de platina, e dividi-la em quatro partes, para serem colocadas em posições distintas em placas de Petri contendo meio mínimo (MM). As placas foram incubadas por cinco dias, a 37 °C.

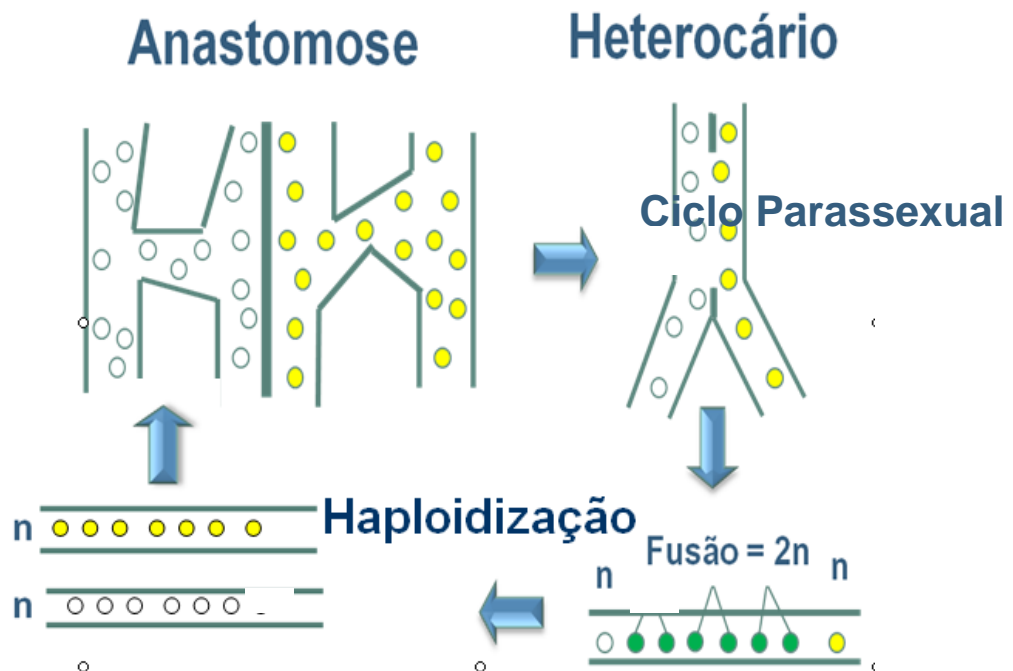


Figura 10 - Esquema Ciclo parassexual em fungos (Modificado de Franco e Castro-Prado, 2007).

Para obter o heterocáριο, conídios de duas linhagens nutricionalmente complementares (Figura 11, Quadro 1 e Figura 13) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de meio mínimo (MM), suplementado com meio completo (MC) (2%). (O MC, ao contrário do meio mínimo, é um meio rico, que permite um discreto desenvolvimento dos conídios, facilitando a anastomose de hifas). Os tubos foram incubados a 37 °C e após um período de 72 horas, observou-se o estabelecimento de uma associação heterocariótica (massa micelial compacta) contendo os dois diferentes tipos de conídios (Figura 12).

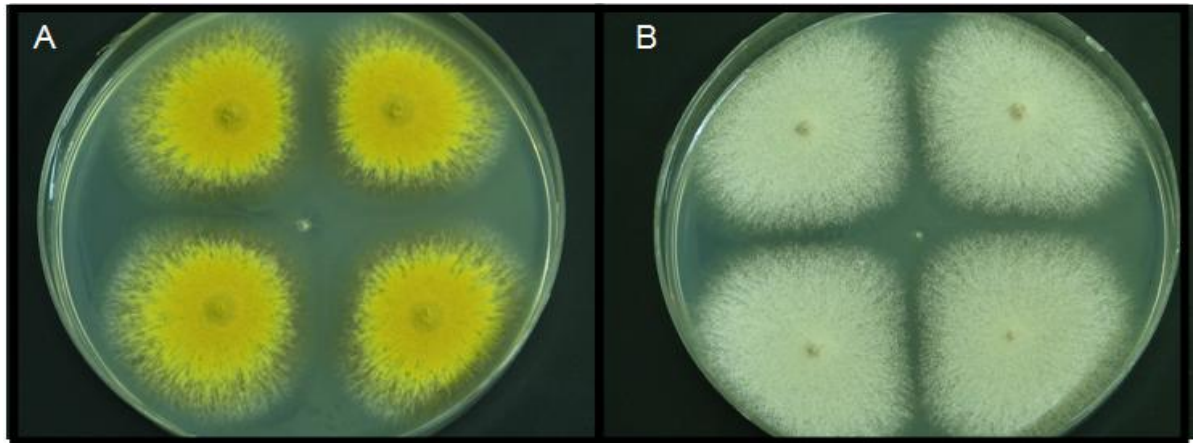


Figura 11 - Linhagens nutricionalmente e geneticamente complementares, utilizadas para obter o diplóide. A) Linhagem A 757. B) Linhagem 448.

Ao término desse período de crescimento da massa micelial, observou-se as regiões heterocarióticas com crescimento mais vigoroso (linhagem diplóide) (Figura 12). Estas foram transferidas para novas placas contendo MM e novamente incubadas por cinco dias a 37 °C. Após este período, os conídios diplóides foram estocados em MM a 5 °C.

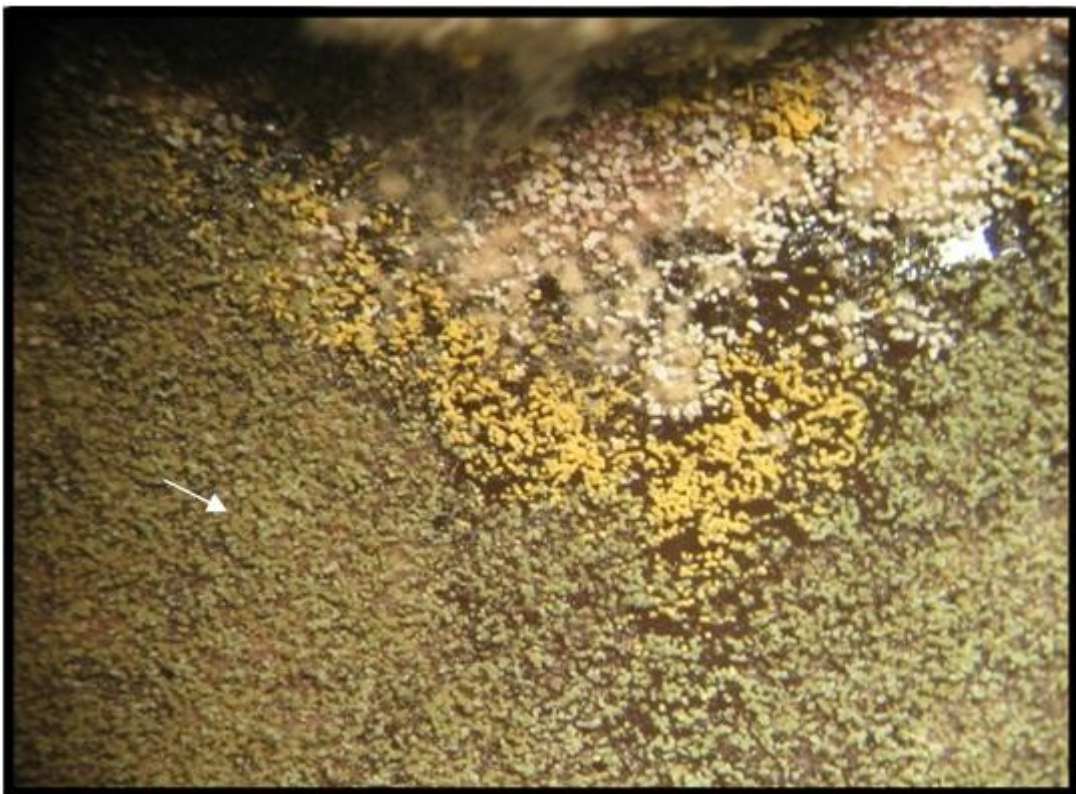


Figura 12 - Diplóide UT448//A757 (seta), originado a partir do heterocário formado entre as linhagens UT448 (conídios brancos) e A757 (conídios amarelos).

Quadro 1 – Genótipo e origem das linhagens de *A. nidulans*

Linhagem	Genótipo	Origem
A757	<i>yA2</i> (I), <i>methA17</i> (II), <i>pyroA4</i> (IV).	FGSC*
UT448	<i>riboA1</i> (I), <i>pabaA124</i> (I), <i>biA1</i> (I), <i>AcrA1</i> (II), <i>wA2</i> (II),	UTRECHT**

Requerimentos para: riboflavina = *riboA1*, ácido p-aminobenzóico = *pabaA124*, biotina = *bioA1*, metionina = *methA17*, piridoxina = *pyroA4*. Coloração do conídio: branco = *wA2*; amarelo = *yA2*. *AcrA1*, resistência à acriflavina, \*FGSC = Fungal Genetic Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas, USA, \*\*UTRECHT = Holanda. Os parênteses representam os cromossomos I, II, III e IV de *A. nidulans*.

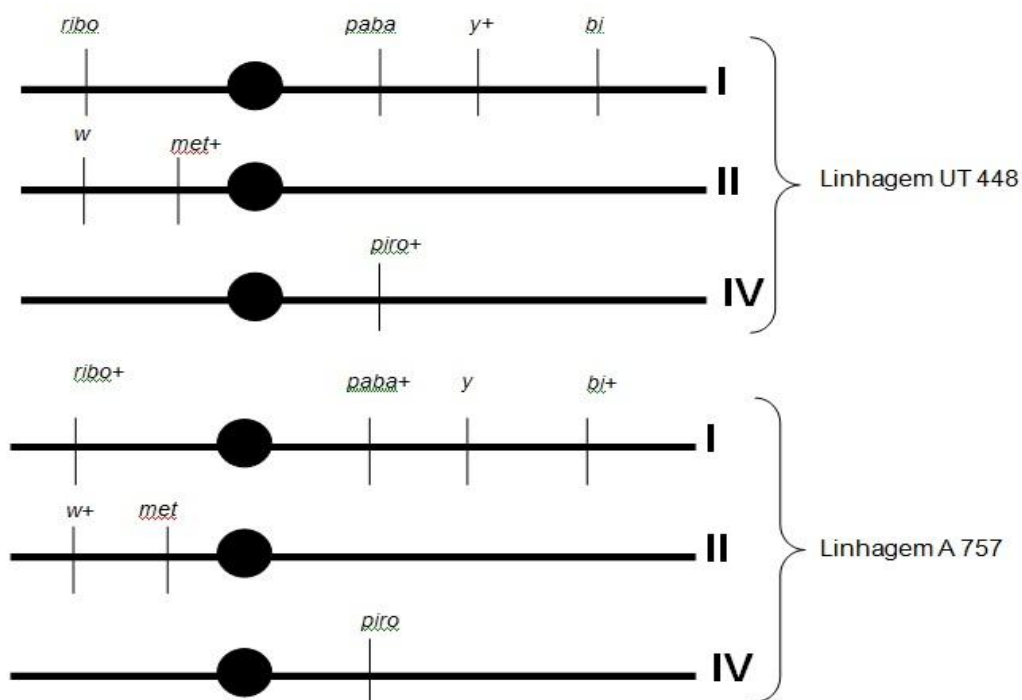


Figura 13 - Genótipo complementar das linhagens UT448 e A757. Posições dos marcadores nutricionais nos cromossomos I, II e IV.

## 3.2. Meios de cultura

### 3.2.1. Meio mínimo (MM)

Para o preparo de 1000 mL de meio mínimo, utiliza-se 900 mL de água destilada, 100 mL da solução meio mínimo concentrado (1000 mL de água destilada; 60,0 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 15,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5,2 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,02 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ); 10 g de glicose e 12 g de Agar.3.2.2.

### 3.2.2. Meio completo (MC)

Para preparar o Meio completo, adiciona-se ao MM (3.2.1): peptona (2.000 mg/L-1), extrato de levedura (500 mg/L-1), caseína hidrolisada (1.000 mg/L-1), glicose (10.000 mg/L-1), biotina (2 mg/L-1), pirodoxina (50 mg/L-1), ácido *para*aminobenzóico (50 mg/L-1), ácido fólico (50 mg/L-1), ácido nicotínico (100 mg/L-1), ácido pantenóico (200 mg/L-1), cloreto de colina (200 mg/L-1), riboflavina (100 mg/L-1), inositol (400 mg/L-1) e tiamina (50 mg/L-1).

### 3.2.3. Meio seletivo (SM)

O meio seletivo é preparado adicionando-se ao MM (3.2.1) os cinco nutrientes requeridos pelas linhagens UT448 e A757: riboflavina (0,1 µg/ml-1), ácido *para*-aminobenzóico (0,6857 µg/ml-1), biotina (0,02 µg/ml-1), metionina (149,21 µg/ml-1) e pirodoxina (0,05 µg/ml-1). Para analisar o fenótipo de cada segregante haplóide, preparam-se diferentes tipos de meio de cultura, omitindo-se um dos nutrientes em cada tipo de meio. Para o controle positivo do crescimento das colônias, um quinto tipo de meio seletivo conterá todos os requerimentos nutricionais necessários para o crescimento das linhagens UT448 e A757. Após o preparo, o pH dos meios de cultura foi ajustado para o valor 6,0 e, então, foram autoclavados a 120 °C a 1,0 atm de pressão, durante 20 minutos. A temperatura de incubação para o crescimento das linhagens foi de 37 °C.

## 3.3. Concentrações dos antineoplásicos

Três concentrações de CPT foram utilizadas: 3,5 ng mL<sup>-1</sup>, 10,5 ng mL<sup>-1</sup>, 17,4 ng mL<sup>-1</sup>. O composto foi adicionado ao MM fundido, após solubilização em hidróxido de sódio 10% (NaOH) (Kirpnick et al., 2005).

O CPT-11, por ser mais solúvel, teve suas três concentrações solubilizadas em hidróxido de sódio 1N (4%): as concentrações de 18 µg mL<sup>-1</sup> e 9 µg mL<sup>-1</sup>, que são equivalentes, respectivamente, às concentrações de 700 mg m<sup>-2</sup> e 350 mg m<sup>-2</sup>, recomendadas na monoterapia, e 4.5 µg mL<sup>-1</sup>, equivalente à concentração terapêutica recomendada para o uso combinado com outro antineoplásico, 180 mg m<sup>-2</sup> (Kašuba et al., 2010).

Estas concentrações de CPT e CPT-11 foram selecionadas por induzirem aumentos significativos na formação de micronúcleo em células de ovário de

hamster Chinês (CHO) (Kipnick et al. 2005), e aberrações cromossômicas e micronúcleo em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) (Kašuba et al., 2010), respectivamente.

### **3.4. Avaliação da citotoxicidade da CPT e do CPT – 11**

Os conídios do diplóide UT448//A757 foram inoculados no centro de cinco placas de Petri, contendo MC + NaOH (10%) (controle), MC + CPT (3,5 ng mL<sup>-1</sup>, 10,5 ng mL<sup>-1</sup>, 17,4 ng mL<sup>-1</sup>), MC + CPT - 11 (18 µg mL<sup>-1</sup>, 9 µg mL<sup>-1</sup> e 4.5 µg mL<sup>-1</sup>) e MC + NaOH (4%) (controle). Os diplóides foram incubados a 37 °C. Para avaliar a citotoxicidade, os diâmetros das colônias foram medidos com o auxílio de uma régua, após 48, 96 e 144 horas de incubação. Os valores obtidos na presença e na ausência da droga foram comparados estatisticamente.

### **3.5. Obtenção dos diplóides tratados com CPT e CPT - 11 e seleção dos segregantes haplóides**

Colônias da linhagem diplóide A757//UT448 de *A. nidulans* foram obtidas em placas de petri contendo MM (controle negativo, diplóides D1 a D3), MM + cisplatina (0,9 µg mL<sup>-1</sup>) (controle positivo, D4 e D5), MM + CPT (diplóides D6 a D14), MM + CPT-11 (diplóides D15 a D23). Os diplóides D4 a D23 apresentaram morfologia distinta do diplóide original (Figura 14A e B e Figura 15A).

Os diplóides obtidos foram purificados em MM, para confirmar seu genótipo prototrófico heterozigoto ou homozigoto. Posteriormente, cada diplóide foi inoculado em MC + benomyl 0,7µg/mL, um agente haploidizante cujo mecanismo de ação é interferir na segregação dos cromossomos durante a mitose. Após sete dias de crescimento em presença de benomyl, retiraram-se destas placas setores coloridos, que resultaram do efeito haploidizante do benomyl (Figura 15B). Estes setores foram purificados em placas de MC (Figura 17C).

O processo de haploidização consiste na perda da condição diplóide das células por meio da não-disjunção cromossômica, durante a mitose. Células aneuplóides (2n – 1; 2n - 2, etc.) podem também ser produzidas nessa etapa. Esses aneuplóides são extremamente instáveis e continuam perdendo cromossomos ao acaso, até que o estágio haplóide seja finalmente atingido. Se o *crossing-over*

mitótico ocorrer antes da haploidização, haplóides recombinantes serão obtidos (Kafer, 1958; Pontecorvo e Kafer, 1958).

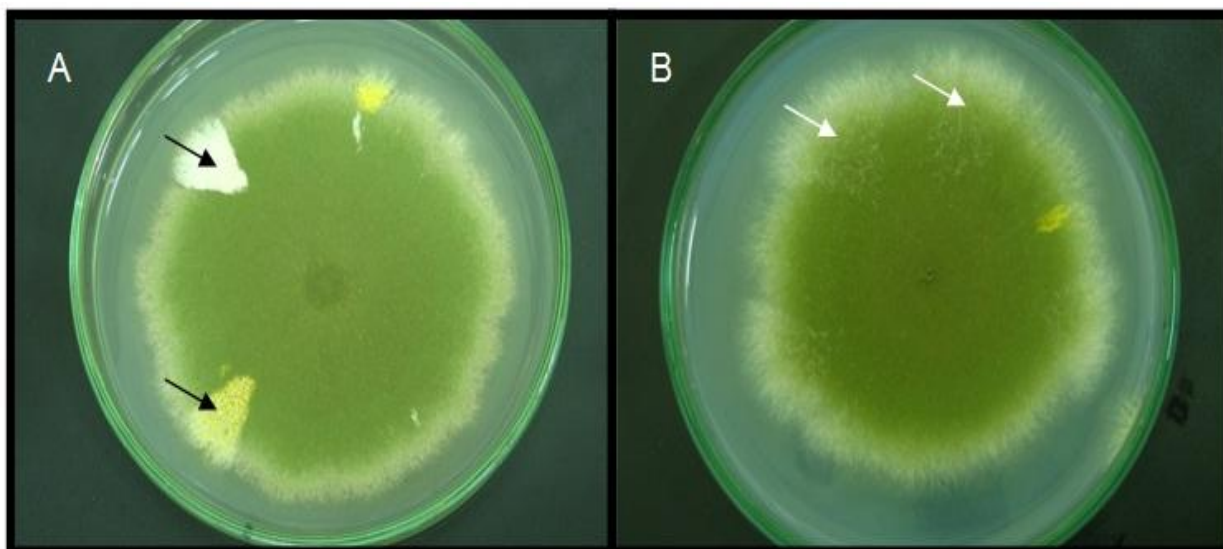


Figura 14 - A) Diplóide UT448/A757 cultivado em MM + CPT na concentração de 3,5  $\text{ng mL}^{-1}$ . B) Diplóide UT448/A757 cultivado em MM + CPT-11 na concentração de 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As setas indicam os diplóides prototróficos selecionados.

Para os testes de recombinação, apenas os segregantes haplóides, derivados dos diplóides tratados foram utilizados. A seleção dos segregantes haplóides foi realizada por meio do teste de instabilidade mitótica (Figura 15 D e E), que consiste em inocular os segregantes em placas de MC + benomyl 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Os segregantes que se apresentaram instáveis, na presença do benomyl, foram descartados da amostra. Conídios de cada setor haplóide foram finalmente transferidos individualmente para placas contendo MC, em 25 posições definidas (modelo 5x5) (Figura 15F). Após 48 horas de incubação a 37 °C, as colônias foram replicadas para os meios seletivos (3.2.3) para determinação do fenótipo dos segregantes haplóides (Figura 16).

### 3.6. Determinação dos índices de homozigotização

O *crossing-over* mitótico induz a homozigotização de genes presentes originalmente em heterozigose. Dessa forma, se os tratamentos do diplóide UT448//A757 com CPT e CPT-11 induzirem recombinação mitótica, somente diplóides prototróficos heterozigotos (+/- ou -/+) ou homozigotos (+/+) serão obtidos,



uma vez que os diplóides auxotróficos (-/-) não se desenvolvem em MM. Após a haploidização destes diplóides, a caracterização fenotípica dos segregantes haplóides (Figura 16) permite o cálculo do Índice de Homozigotização (HI) para cada marcador utilizado. Os valores de HI são calculados através da fórmula:

$$HI = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de segregantes prototróficos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de segregantes auxotrófico}}$$

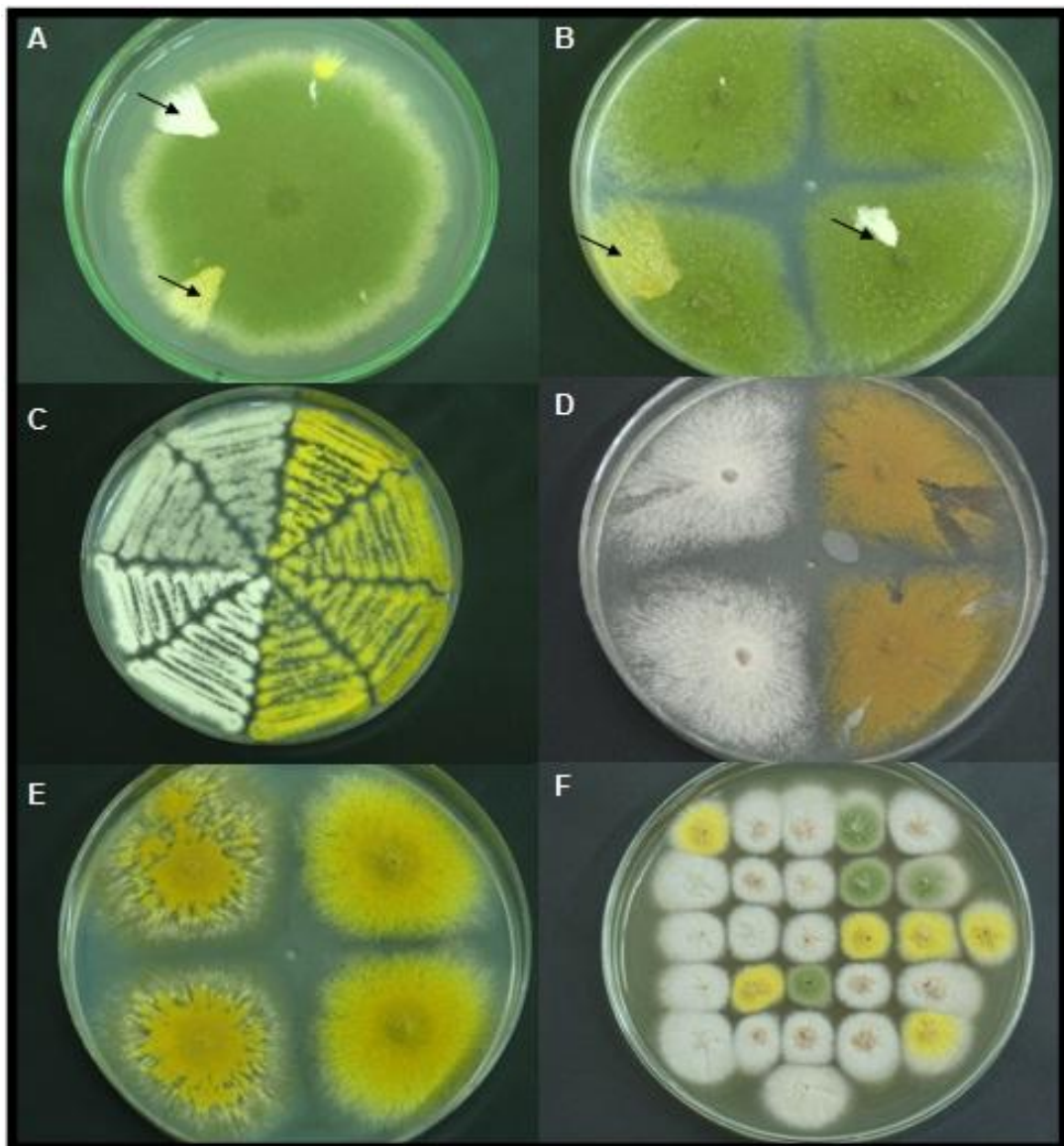


Figura 15 - Análise fenotípica dos segregantes haplóides. Cada placa mestra é replicada para diferentes meios seletivos. Em cada placa é omitido um, dos cinco requerimentos nutricionais. A) Placa controle contendo todos os requerimentos nutricionais (SM). B) Placa onde o requerimento biotina foi omitido. C) Ausência do requerimento metionina. D) Placa com ausência de piridoxina. E) Ausência do requerimento ácido *p* - aminobenzóico. F) Ausência do requerimento riboflavina.

Os HIs obtidos em presença e em ausência dos agentes antineoplásicos, e em presença de NaOH, foram comparados utilizando-se o teste do Chi-Quadrado com a correção de Yates, pela Tabela de Contingência

Se os tratamentos com os agentes anticancerígenos induziram recombinação mitótica, o HI para um determinado marcador nutricional será igual ou superior ao valor 2,0 (Figura 17). Valores de HIs inferiores a 2,0 indicam ausência de *crossing-over* para um dado gene (Figura 17).

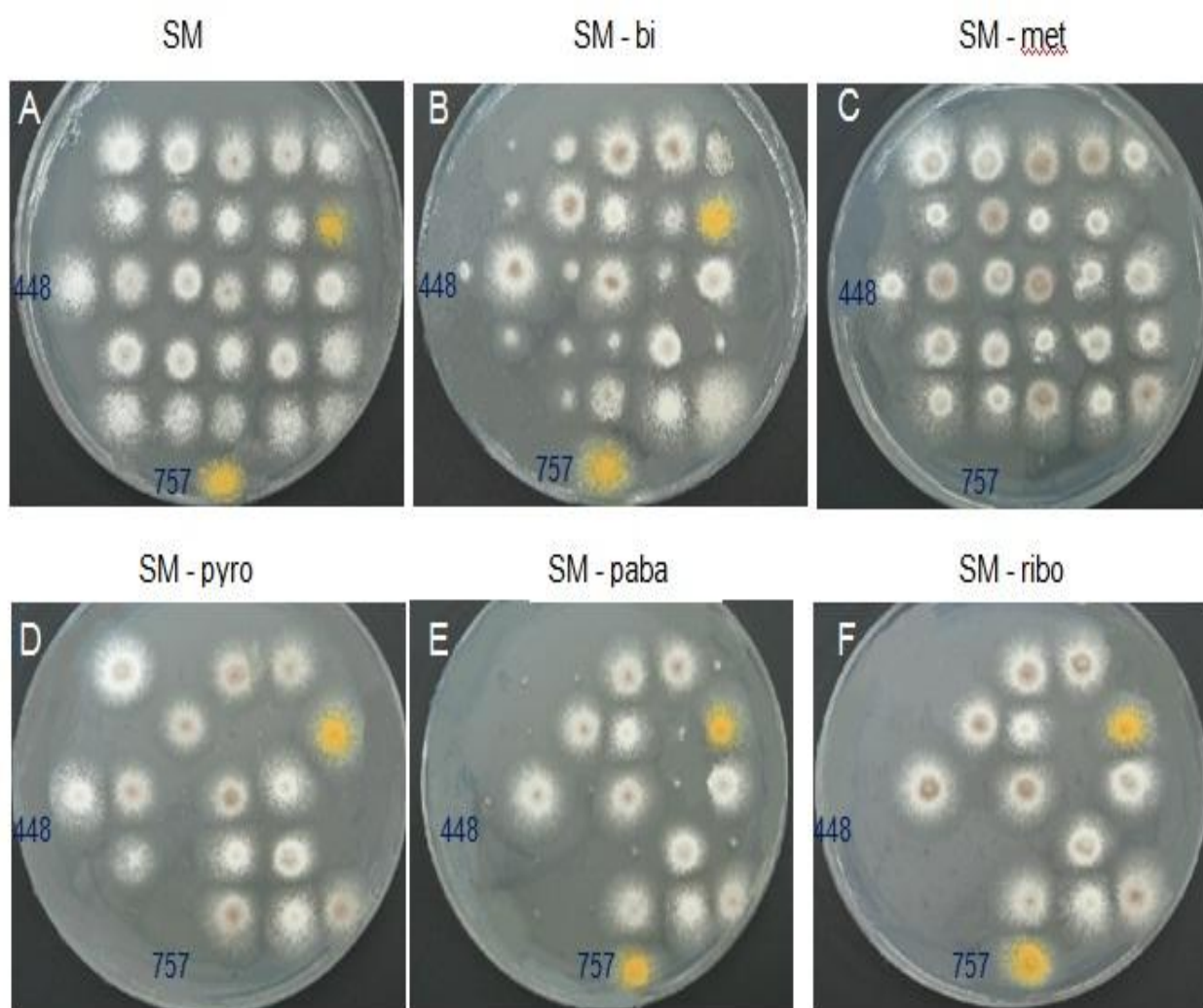


Figura 16 - A) Diplóide UT448//A757 cultivado em presença de CPT na concentração de  $3,5 \text{ ng mL}^{-1}$ . A seta indica um diplóide prototrófico. B) Diplóide prototrófico selecionado da placa da imagem A, crescendo em presença de benomyl ( $0,7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As setas indicam a origem de segregantes mitóticos. C) Purificação dos segregantes obtidos da placa da imagem B, em placas de meio completo (MC). D) Segregantes instáveis em presença de  $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  benomyl. E) Segregantes aneuplóides (à esquerda) e haplóides (à direita) cultivados em presença de  $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de benomyl. H). F) Placa mestra de MC, contendo todos os segregantes obtidos (modeo 5X5).

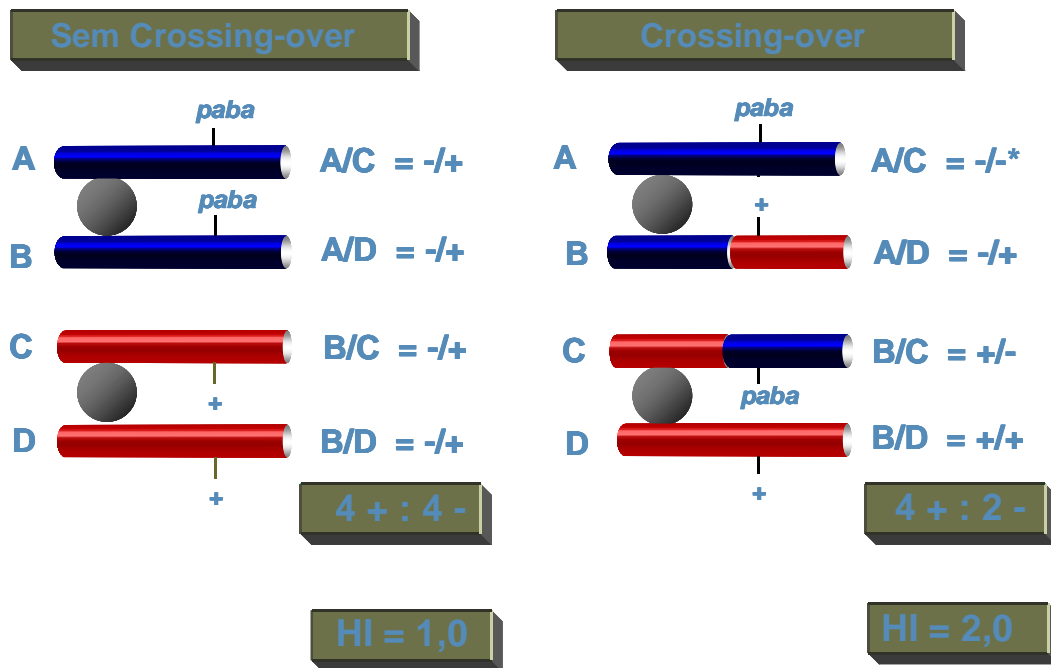


Figura 17 - Origem dos diplóides heterozigotos (-/+ e +/-) e homozigoto (+/+) resultantes do *crossing-over* mitótico entre o gene *paba* e o centrômero. \*Diplóides homozigotos (-/-) não são selecionados em MM.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os antineoplásicos CPT e CPT-11, nas concentrações estudadas, não demonstraram citotoxicidade, uma vez que o crescimento micelial do diplóide UT448//A757, em presença destes compostos, não foi significativamente diferente do controle (Figuras 18 e 19). O potencial citotóxico da CPT foi, entretanto, observado em células de fibroblastos de hamster chinês e em células linfoblásticas leucêmicas (L1210). Nestas células, este alcalóide inibiu tanto a síntese de DNA quanto de RNA (Li, 1972).

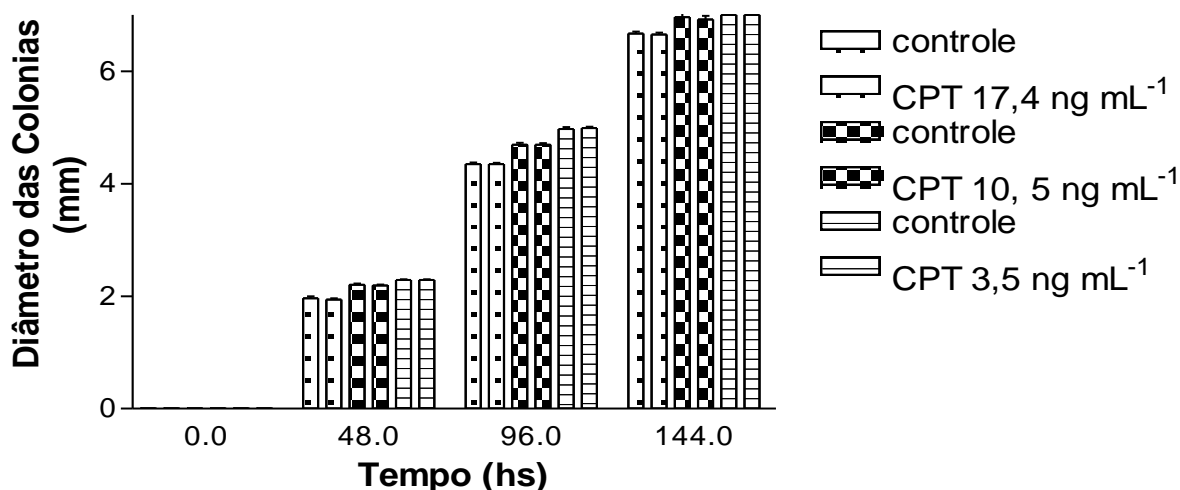


Figura 18 - Crescimento do diplóide UT448//A757 em meio completo (MC) e em MC + CPT (17,4 ng mL<sup>-1</sup>, 10,5 ng mL<sup>-1</sup> e 3,5 ng mL<sup>-1</sup>).

Os valores de HI dos diplóides obtidos em MM (controle negativo) foram menores que 2,0 e não mostraram diferença significativa dos valores de HI dos diplóides obtidos em MM + NaOH (10%). Estes resultados demonstram que o NaOH não apresenta genotoxicidade (Quadro 2)

A metodologia para a obtenção do HI não permite o isolamento de diplóides auxotróficos (-/-), pois esses não se desenvolvem em MM. É possível, porém, obter-se diplóides homocigotos recessivos para os marcadores de coloração de conídios (*yA1* e *wA2*).

O potencial recombinagênico da CPT e do CPT-11 foi avaliado através dos índices de homocigotização dos marcadores nutricionais: *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* e

*piroA4*, previamente em heterozigose na linhagem diplóide de *A. nidulans*. (Pires e Zucchi, 1994).

Quadro 2 - Índices de Homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, cultivado em MM e MM + NaOH (10%)

Marcadores <sup>a</sup>	Controle 1 <sup>b</sup>		Controle 2 <sup>c</sup>	
	NS <sup>d</sup>	HI	NS <sup>d</sup>	HI
<i>ribo+</i>	64	1,56	64	1,56
<i>ribo</i>	41		41	
<i>paba+</i>	64	1,56	60	1,3
<i>paba</i>	41		45	
<i>bi+</i>	64	1,56	67	1,76
<i>bi</i>	41		38	
<i>piro+</i>	66	1,69	51	0,94
<i>piro</i>	39		54	

<sup>a</sup> *ribo* = riboflavina; *paba* = ácido *p*-aminobenzóico; *bi* = biotina; *met* = metionina e *piro* = piridoxina. <sup>b</sup>Diplóide cultivado em MM. <sup>c</sup>Diplóide cultivado em MM + NaOH (10%). <sup>d</sup>Número de segregantes mitóticos

Os diplóides D1 a D23 foram purificados em MM para comprovar seus fenótipos prototróficos. Posteriormente, os diplóides foram inoculados em placas de petri contendo MC + benomyl (0,7 µg/mL). O benomyl permitiu a obtenção de segregantes mitóticos (Figura 15B). Os segregantes estáveis (Figura 15F) foram então inoculados em 25 posições definidas, em placas contendo MC (modelo 5X5) para posterior análise fenotípica (Figura 16).

No teste de recombinação, todas as concentrações de CPT (3,5 ng mL<sup>-1</sup>, 10,5 ng mL<sup>-1</sup>, e 17,4 ng mL<sup>-1</sup>) mostraram-se capazes de induzir o *crossing-over* mitótico (Quadro 3).

Os segregantes mitóticos derivados dos diplóides D12 a D14, obtidos com 17,4 ng mL<sup>-1</sup> de CPT (Quadro 3), exibiram HIs maiores que 2,0 e significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle, para três marcadores nutricionais, *riboA1*, *pabaA124* e *biA1*. Valores de HI estatisticamente significativos para todos os marcadores nutricionais analisados foram também obtidos para os diplóides D9 a D11, tratados com 10,5 ng mL<sup>-1</sup> de CPT. A análise fenotípica dos diplóides tratados com a menor

concentração de CPT ( $3,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) permitiu a obtenção de valores de HIs maiores que 2,0 apenas para os genes *paba A124* e *biA1* (Quadro 3).

Um total de vinte e três diplóides foram avaliados no presente estudo, três deles (D1 a D3) obtidos em MM (controle negativo), dois diplóides (D4 e D5) obtidos em presença de  $0,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de cisplatina (controle positivo), nove diplóides em presença de CPT (D6 a D14) (Figura 14) e nove diplóides em presença de CPT-11 (D15 a D23).

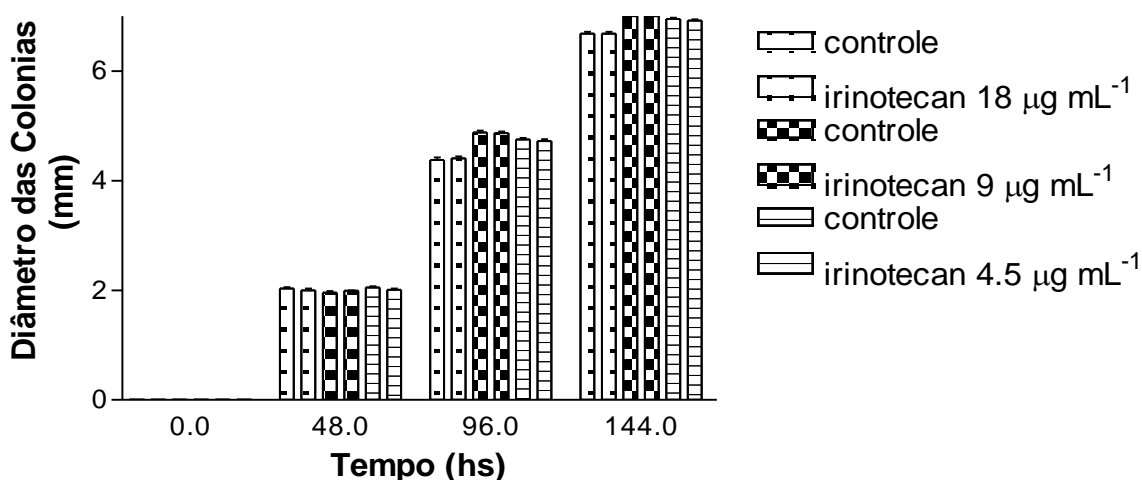


Figura 19 - Crescimento do diplóide UT448//A757 em meio completo (MC) e em MC + CPT-11 ( $18 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $4,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Analisando-se a segregação dos marcadores *riboA1* e *piroA4*, entre os segregantes mitóticos dos diplóides D6 a D14, podemos concluir que tais genes encontram-se em heterozigose. Por outro lado, a ausência de segregantes auxotróficos para os genes *pabaA124* e *biA1*, entre os haplóides derivados dos diplóides D8 ( $3,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ), D11 ( $10,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e D14 ( $17,4 \text{ ng mL}^{-1}$ ), sugere que esses marcadores encontram-se em homozigose nestes diplóides. Desta forma, o genótipo dos diplóides D8, D11 e D14 para estes marcadores é provavelmente *ribo*, *paba*<sup>+</sup>, *bi*<sup>+</sup>, // *ribo*<sup>+</sup>, *paba*<sup>+</sup>, *bi*<sup>+</sup>.

O potencial recombinagênico da CPT observado no presente estudo pode ser atribuído a sua capacidade de induzir quebras cromossômicas. Mossesso (1999) demonstrou que a concentração de  $100 \text{ } \mu\text{M}$  de CPT produz quebras de cromátides irmãs no DNA de linfócitos humanos.

Os efeitos clastogênicos e aneugênicos da CPT foram observados por meio do teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongo e da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), de Attia et al. (2009). Sortibrán et al. (2006) também observaram o potencial clastogênico da CPT por meio do estudo de células somáticas de *Drosophila melanogaster* tratadas com as concentrações de 0.01 mM, 0.025 mM, e 0.05 mM.

As quebras nas fitas de DNA induzidas por agentes genotóxicos como o 5-fluorouracil e CPT podem promover danos à célula, tais como morte celular nos organismos unicelulares e neoplasias nos multicelulares, ou ainda favorecer os processos de deleção, translocação e principalmente a recombinação mitótica (Matuo e Henriques, 2008).

Backer et al. (1990) observaram os efeitos clastogênicos da CPT nas concentrações de 0,5 mg/kg, 1,5 mg/kg e 3,0 mg/kg, em células de medula óssea de camundongo e de sangue periférico *in vivo* e em células de linfoma de camundongo *in vitro*. Mosezzo et al. (2000) demonstraram em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) que a CPT, nas concentrações de 12,5 mM e 20 mM, induziu quebras e troca entre cromátides irmãs.

O potencial recombinagênico da CPT, observado em linfócitos humanos *in vitro*, foi associado ao efeito clastogênico deste antineoplásico (Ribas, 1996). Neste estudo, o autor demonstrou os potenciais recombinagênicos de quatro inibidores de topoisomerase: m-ansacrina, CPT, etoposida e ácido nalidíxico, através da indução de trocas entre cromátides irmãs, em cultura de linfócitos humanos. A CPT foi o agente recombinagênico mais eficaz, além de apresentar atividade clastogênica nas concentrações variando de 0,005 µM a 0,025 µM.

Resultados significativos também foram observados por Torres et al. (1998), ao estudarem os efeitos da CPT nas concentrações de 0,005 mM, 0,01 mM e 0,02 mM, em *D. melanogaster*. Os autores observaram que a CPT induziu aumento significativo, dose-dependente, na frequência de mutações na asa de *D. Melanogaster*. Porém, a recombinação mitótica foi seu efeito predominante, demonstrando que este fármaco tem potencial recombinagênico em larvas de *D. melanogaster* (Torres et al., 1998).

Todos esses resultados corroboram as observações de Cunha et al. (2002) que definem como preponderante o efeito recombinagênico da CPT em células eucariotas. Como o potencial recombinagênico de um fármaco pode estar associado

ao potencial de induzir neoplasia secundária, estes dados sugerem que a CPT pode acelerar o processo de desenvolvimento de neoplasias secundárias em pacientes tratados com este quimioterápico (Hashimoto et al., 1995).

O tratamento do diplóide UT448//A757 com as três concentrações de CPT-11 permitiu a obtenção de nove diplóides prototróficos (D15 a D23) (Quadro 4). Todos os diplóides foram também purificados em MM e então inoculados em MC + benomyl (0.7 µg/mL) para a obtenção de segregantes mitóticos haplóides. Os segregantes estáveis foram inoculados em placas contendo MC, em 25 posições definidas (modelo 5x5), para então serem analisados fenotipicamente.

Nosso estudo demonstrou que apenas a maior concentração de CPT-11 utilizada (18 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou ação recombinagênica. Os diplóides D21 a D23, obtidos com 18 µg mL<sup>-1</sup> de CPT-11, apresentaram valores de HI = 2,0 e significativamente diferentes do controle para os marcadores *riboA1* e *pabaA124*, do cromossomo I (Quadro 4). De acordo com Kašuba et al. (2010), a concentração de 18 µg mL<sup>-1</sup> de CPT-11 corresponde à dose única máxima de 700 mg m<sup>-2</sup>, recomendada em protocolos de quimioterapia para o tratamento de cânceres humanos.

As demais concentrações de CPT-11 (9 µg mL<sup>-1</sup> e 4,5 µg mL<sup>-1</sup>) não induziram homozigotização dos marcadores estudados. Estas concentrações são também utilizadas, respectivamente, em protocolos de monoterapia e terapia combinada, no tratamento de diversos tipos de cânceres humanos, tais como neoplasia pulmonar e gástrica (Kašuba et al, 2010). Estudos anteriores demonstraram que o CPT-11, quando utilizado na concentração de 9 µg mL<sup>-1</sup> apresentou efeitos genotóxicos em células sanguíneas humanas (Kopjar et al. 2007). Assim como quando utilizado em associação com outros agentes antineoplásicos, o CPT-11 induziu aumento significativo na frequência de danos na molécula do DNA (Kontek et al., 2010).

O CPT-11 é uma pró-droga pouco ativa contra a enzima topo I, mas seu metabólito ativo Sn-38 é um dos mais potentes inibidores de topo I. Estudos anteriores, comparando a farmacologia molecular e celular de vários derivados da CPT, sugerem que a atividade clínica do CPT-11 depende de sua hidrólise a SN-38, por uma enzima carboxilesterase (Tanizawa et al., 1994). Desta forma, o efeito recombinagênico do CPT-11, observado no presente estudo somente na maior



concentração, pode ser resultado de uma baixa conversão do CPT-11 em Sn-38 em células diplóides de *A. nidulans*.

Attia et al. (2009) demonstraram os efeitos genotóxicos do CPT-11 por meio do teste do micronúcleo (MN), em camundongos tratados via intraperitoneal com 60 mg/Kg. O CPT-11 aumentou significativamente a frequência de micronúcleo (0.83% de aumento na frequência de MN) quando comparado com o controle (0.33% de aumento). Contudo, este fármaco causou menor frequência de danos ao DNA, quando comparado com a CPT que induziu um aumento de 1,07% na frequência de MN.

Nossos resultados corroboram os estudos de Cunha et al. (2002) que demonstram que o CPT-11 causa menor frequência de danos ao DNA que a CPT, confirmando que este análogo semissintético alcançou o objetivo das pesquisas por fármacos com ação antineoplásica e baixa toxicidade (Kaneda et al., 1990). Em *D. melanogaster*, o efeito genotóxico do CPT-11 foi comparativamente menor que o da CPT, principalmente quanto aos efeitos mutagênicos e recombinagênicos (Cunha et al., 2002).

Bassi e Palitti (2000) observaram que os inibidores de topoisomerase são em geral muito eficazes como antineoplásicos, mas também são potentes indutores de aberrações cromossômicas, característica esta que pode aumentar a incidência de malignidades secundárias.

Os efeitos genotóxicos dos antineoplásicos podem resultar em vários tipos de alterações, tais como: deleção, translocação e recombinação homóloga, processo este essencial ao reparo do DNA (Pedersen-Bjergaard e Rowley, 1994).

Considerando-se, portanto, que a recombinação somática pode resultar na perda do alelo funcional de um gene supressor de tumor ou ainda induzir a homozigotização de genes deletérios e que inibidores de topo I, tal como a CPT e o CPT-11, elevam a frequência da recombinação mitótica, acredita-se que tais antineoplásicos possam atuar como indutores de malignidades secundárias (Hashimoto et al., 1995; Marks et al., 2000; Seedhouse e Russell, 2007; Roy e Eastmond, 2011), devido à perda da condição de heterozigose. Isso resultaria em homozigose ou hemizigose, com a subsequente expressão do alelo deletério (Zimmermann et al., 1966; Lasko et al., 1991; Kaneshima e Castro-Prado, 2005; Souza-Junior e Castro-Prado, 2005; Franco et al., 2010).

Quadro 3 - Índice de homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, após tratamento com 3,5 ng mL<sup>-1</sup> (D6-D8), 10,5 ng mL<sup>-1</sup> (D9-D11) 17,4 ng mL<sup>-1</sup> (D12-D14) de camptotecina

Marcadores <sup>a</sup>	D1 <sup>b</sup>	D2 <sup>b</sup>	D3 <sup>b</sup>	D4 <sup>c</sup> D5 <sup>c</sup>			D6 D7 D8				D9 D10 D11				D12 D13 D14									
	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI
<i>ribo+</i>	41	39	49	129	1.4	106	88	194	1.6	105	111	152	368	1.6	98	109	106	313	<b>2.2*</b>	159	111	190	460	<b>2.2*</b>
<i>ribo</i>	30	30	32	92		52	68	120		50	55	120	225		35	34	73	142		60	60	91	211	
<i>paba+</i>	41	37	48	126	1.3	106	103	209	<b>2.0*</b>	106	109	272	487	<b>4.6*</b>	101	107	179	387	<b>5.7*</b>	157	110	281	548	<b>4.5*</b>
<i>paba</i>	30	32	33	95		52	53	105		49	57	0	106		32	36	0	68		62	61	0	123	
<i>bi+</i>	44	38	47	129	1.4	102	88	190	1.5	105	107	272	484	<b>4.4*</b>	103	109	179	391	<b>6.1*</b>	157	114	281	552	<b>4.6*</b>
<i>bi</i>	27	31	34	92		56	68	124		50	59	0	109		30	34	0	64		62	57	0	119	
<i>piro+</i>	33	36	43	112	1.0	134	155	289	<b>11.6*</b>	81	80	162	323	1.2	105	99	115	319	<b>2.3*</b>	126	117	182	425	1.7
<i>piro</i>	38	33	38	109		25	0	25		74	86	110	270		28	44	64	136		93	54	99	246	

<sup>a</sup> *ribo* = riboflavina; *paba* = ácido *p*-aminobenzóico; *bi* = biotina; *meti* = metionina e *piro* = piridoxine. <sup>b</sup>Diplóides D1-D3, controle negativo (não tratado com camptotecina ou com cisplatina). <sup>c</sup>Diplóides D4-D5, controle positivo (tratado com 0,9 µg mL<sup>-1</sup> de cisplatina). <sup>d</sup>Número de segregantes mitóticos. \*Significativamente diferente do controle (Teste do Chi Quadrado com a correção de Yates, p<0,05).

Quadro 4 - Índice de homozigotização (HI) para os marcadores do diplóide UT448//A757, após tratamento com 4,5 µg mL<sup>-1</sup> (D15 – D17), 9 µg mL<sup>-1</sup> (D18 – D20) e 18 µg mL<sup>-1</sup> (D21 – D23) de irinotecan

Marcadores <sup>a</sup>	D1 <sup>b</sup>	D2 <sup>b</sup>	D3 <sup>b</sup>	D4 <sup>c</sup> D5 <sup>c</sup>			D15 D16 D17				D18 D19 D20				D21 D22 D23									
	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	NS <sup>d</sup>	Total	HI
<i>ribo+</i>	41	39	49	129	1.4	106	88	194	1.6	100	70	84	254	1.0	96	121	80	297	1.2	110	157	176	444	<b>2.0*</b>
<i>ribo</i>	30	30	32	92		52	68	120		90	79	79	248		75	85	87	247		79	60	89	227	
<i>paba+</i>	41	37	48	126	1.3	106	103	209	<b>2.0*</b>	102	71	83	256	1.0	94	121	82	297	1.2	112	156	177	445	<b>2.0*</b>
<i>paba</i>	30	32	33	95		52	53	105		88	78	80	246		77	85	85	247		77	61	88	226	
<i>bi+</i>	44	38	47	129	1.4	102	88	190	1.5	97	70	81	248	1.0	88	114	82	284	1.1	111	156	169	436	1.9
<i>bi</i>	27	31	34	92		56	68	124		93	79	82	254		83	92	85	260		78	61	96	235	
<i>piro+</i>	33	36	43	112	1.0	133	156	289	<b>11.6*</b>	95	68	87	250	1.0	87	101	79	267	1.0	103	131	133	367	1.2
<i>piro</i>	38	33	38	109		25	0	25		95	81	76	252		84	105	88	277		86	86	132	304	

<sup>a</sup> *ribo* = riboflavina; *paba* = ácido *p*-aminobenzóico; *bi* = biotina; *met* = metionina e *piro* = piridoxine. <sup>b</sup> Diplóides D1-D3, controle negativo (não tratado com camptotecina ou com cisplatina). <sup>c</sup> Diplóides D4-D5, controle positivo (tratado com 0,9 µg mL<sup>-1</sup> de cisplatina). <sup>d</sup> Número de segregantes mitóticos. \*Significativamente diferente do controle. (Teste do Chi Quadrado com a correção de Yates, p<0,05).

Neoplásias secundárias decorrentes da quimioterapia constituem principalmente leucemias mielóide crônica ou aguda (Seedhouse e Russell, 2007; Godley e Larson, 2008). Sendo assim, uma avaliação detalhada do potencial genotóxico de agentes antineoplásicos, comumente utilizada em protocolos de quimioterapia, justifica-se pela existência de relatos da ocorrência de cânceres secundários em pacientes submetidos a este tipo de tratamento (Seedhouse e Russell, 2007; Attia et al., 2009; Roy e Eastmond, 2011).

Considerando-se: a) que no presente estudo todas as concentrações de CPT e apenas a maior concentração de CPT-11 demonstraram potencial recombinagênico, b) que a recombinação mitótica está intrinsecamente relacionada com a perda da heterozigosidade (Young et al., 2006), e c) que esta por sua vez está associada ao processo de carcinogênese (Gupta et al., 1997), nossos resultados sugerem que tanto a CPT quanto a maior concentração de CPT-11 podem induzir neoplasias secundárias.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Os antineoplásicos CPT e CPT-11 são potentes indutores de *crossing-over* mitótico em *A. nidulans*, porém os efeitos recombinagênicos da CPT foram observados em concentrações inferiores à concentração recombinagênica de CPT-11. Desta forma o CPT-11 causa menos danos ao DNA que a CPT.
- b) O CPT-11 mostrou-se recombinagênico apenas na maior concentração utilizada, correspondente à dose única máxima utilizada em quimioterapia (protocolos de quimioterapia).
- c) Considerando-se a participação da recombinação homóloga no processo de carcinogênese, os inibidores de topo I estudados, CPT e CPT-11, podem ser caracterizados como agentes promotores de neoplasias secundárias.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABELSON, H.T.; PENMAN, S. Selective interruption of high molecular weight RNA synthesis in hela cells by camptothecin. **Nature New Biology**, 237:144-146, 1972.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D.J. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 1661p.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, 2:81-88, 2000.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 19, março, 2012.
- ATTIA, S.M.; ALEISA, A.M.; BAKHEET, S.A.; AL-YAHYA, A.A.; AL-REJAIE, S.S.; ASHOUR, A.E.; AL-SHABANAH, O.A. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of micronuclei formation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 50:145-151, 2009.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microorganismo**. Goiânia: Editora UFG, 1998. 479p.
- BACKER, L.C.; ALLEN, J.W.; HARRINGTON-BROCK, K.; CAMPBELL, J.A.; DEMARINI, D.M.; DOERR, C.L.; HOWARD, D.R.; KLIGERMAN, A.D.; MOORE, M. M. Genotoxicity of inhibitors of DNA topoisomerases I (camptothecin) and II (m-AMSA) *in vivo* and *in vitro*. **Mutagenesis**, 5:541-547, 1990.
- BASSI, L.; PALITTI, F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, 23:1065-1069, 2000.
- BERGEN, L.G.; MORRIS, N.R. Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, 126:155-160, 1983.
- BEUMER, K.J.; PIMPINELLI, S.; GOLIC, K.G. Induced chromosomal exchange directs the segregation of recombinant chromatids in mitosis of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 150:173-188, 1998.

BOEGE, F.; STRAUB, T.; KEHR, A.; BOESENBERG, C.; CHRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, A.; JAKOB, F.; KÖHRLE, J. Selected novel flavones inhibit the dna binding or the dna religation step of eukaryotic topoisomerase I. **The Journal Of Biological Chemistry**, 271:2262–2270, 1996.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, 681:209–229, 2009.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. **Goodman e Gilman – Manual de farmacologia e terapêutica**. São Paulo: Artmed, 2010. 1219p.

CAVENEY, W.K.; SCRABLE, H.J.; JAMES, C.D. Molecular genetics of human cancer predisposition and progression. **Mutation Research**, 247:199-202, 1991.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, 70:369–413, 2001.

COLLINS, T.R.L.; HAMMES, G.G.; HSIEH, T. Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective. **Nucleic Acids Research**, 37:712–720, 2009.

CONSTANTINO, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, 58:217-225, 1995.

CORBETT, K.D.; BERGER, J.M. Structure, Molecular mechanisms, and evolutionary relationships in dna topoisomerases. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, 33:95-118, 2004.

CUNHA, K.S.; REGULY, M.L.; GRAF, U.; ANDRADE, H.H.R. Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. **Mutagenesis**, 17:141-147, 2002.

DANCEY, J.; EISENHAEUER, E.A. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. **British Journal of Cancer**, 74:327-338, 1996.

D'ARPA, P.; BEARDMORE, C.; LIU, F.L. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. **Clinical Cancer Research**, 50:6919-6924, 1990.

ERDTMANN, B. A Genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (eds.). **Genética toxicological**. Porto Alegre: **Alcance**, 2003. p. 167-168.

FERGUSON L.R.; DENNY W.A. Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilized resource in mutagenesis. **Mutation Research**, 331:1-26, 1995.

FERREIRA, A.G.; LEMOS-SENNA, E.M.T. **Preparação, caracterização e avaliação da atividade in vitro antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. 132p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

FORTUNE, J.M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Nucleic Acid Research & Molecular Biology**, 64:221-253, 2000.

FRANCO, C.C.S.; CASTRO-PRADO, J.; ROSADA, L.J.; SANT`ANNA, J.R. CASTRO-PRADO, M.A.A. Mitotic recombination: a genotoxic effect of the antidepressant citalopram in *Aspergillus nidulans*. **Experimental Biology and Medicine**, 235:1257-1262, 2010.

FRANCO, C.C.S.; CASTRO-PRADO, M.A.A. **Genotoxicidade do antiinflamatório não-esteroidal sulfeto de sulindaco em *Aspergillus nidulans***, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

GALAGAN J.E.; CALVO S.E.; CUOMO C.; MA, L.; WORTMAN J.R.; BATZOGLOU S.; LEE S.; TÜRKMEN M.B.; SPEVAK C.C.; CLUTTERBUCK J.; KAPITONOV V.; JURKA J.; SCAZZOCCHIO C.; FARMAN, M.; BUTLER J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G.H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G.H.; PEDERSEN, D.B.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN J. H.; YU, J.; VIENKEN K.; PAIN A.; FREITAG M.; SELKER E.U.; ARCHER, D.B.; PEN`ALVA M.A.; OAKLEY, B.R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W.C.; DENNING, D.W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; PAUL DYER, P.; SACHS, M.S.; OSMANI, S.A.; BIRREN, B.W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, 438:22-29, 2005.



GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J.G. Current Perspectives on the Clinical Experience, Pharmacology, and Continued Development of the Camptothecins. **Clinical Cancer Research**, 8:641–661, 2002.

GODLEY, L.A.; LARSON, R.A. Therapy-related Myeloid Leukemia. **Seminars in Oncology**, 35:418-429, 2008

GOTTLIEB, J.A.; GUARINO, A.M.; CALL, J.B.; OLIVERO, V.T.; BLOCK, J.B. Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium. **Cancer Chemother**, 54:461-470, 1970.

GOODMAN, M.; MCCAHERN, W.J. Plant Antitumor Agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, 88:3888-3890, 1966.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28:129-139, 2007.

GUPTA, P.K.; SAHOTA, A.; BOYADJIE, S.A.; BYE, S.; SHAO, C.; O'NEIL, J.P.; HUNTER, T.C.; ALBERTINI, R.J.; STAMBROOK, P.J.; TISCHFLELD, J.A. HIGH Frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. **Clinical Cancer Research**, 57:1188-1193, 1997.

HASHIMOTO, H.; CHATTERJEE, S.; BERGER, N.A. Mutagenic activity of topoisomerase I inhibitors. **Clinical Cancer Research**, 1:369-376, 1995.

HENGSTLER, J.G.; HEIMERDINGER, C.K.; SCHIFFER, I.B.; GEBHARD, S.; SAGEMÜLLER, J.; TANNER, B.; BOLT, H.M.; OESCH, F. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? **Experimental and Clinical Sciences International online journal for advances in science**, 1:8-14, 2002.

HSIANG, Y.H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L.F. Camptothecin induces protein-linked dna breaks via Mammalian dna topoisomerase I. **The Journal of Biological Chemistry**, 260:14873-14878, 1985.

HSIANG, Y.H.; LIU, L.F.; WALL, M.E.; WANI, M.C.; NICHOLAS, A.W.; MANIKUMAR, G.; KIRSCHENBAUM, S.; SILBER, R. POTMESIL, M. DNA Topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. **Clinical Cancer Research**, 49:4385-4389, 1989.

KAFER, E. An 8 - chromosome map of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 9:105-145, 1958.

KANEDA, N.; NAGATA, H.; FURUTA, T.; YOKOKURA, T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue Cpt-11 In The Mouse. **Clinical Cancer Research**, 50:1715-1720, 1990.

KANESHIMA, E.N.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Benznidazole-induced genotoxicity in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100:325-329, 2005.

KAŠUBA, V.; ROZGAJ, R.; GAMULIN, M.; TROŠIÆ, I. Assessment of cyto/genotoxicity of irinotecan in v79 cells using the comet, micronucleus, and chromosome aberration assay. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**. 61:1-9, 2010.

KAWATO, Y.; ANIMIMI, M.; HIROTA, Y.; KUGA, H.; SATO, K. Intracellular roles Of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, In the antitumor effect of CPT-11. **Clinical Cancer Research**, 51:4187-4191, 1991.

KHADKA, D.B.; CHO, W. 3-Arylisoquinolines as novel topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19:724–734, 2011.

KIKUCHI, I.S.; PINTO, T.J.A. Clinical implications of mutagenic antineoplastic drugs. **Revista Brasileira de medicina**, 38:201-205, 2005.

KIRPNICK, Z.; HOMISKI, M.; RUBITSKI, E.; REPNEVSKAYA, M.; HOWLETT, N.; AUBRECHT, J.; SCHIESTL, R.H. Yeast DEL assay detects clastogens. **Mutation Research**, 582:116–134, 2005.

KOLLING, D.J.; KRATZ, J.M.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Padronização in vitro da técnica do micronúcleo em células vero para detecção de genotoxicidade.

Ciência da Saúde. In: 58° REUNIÃO DA SBPC. Florianópolis, 2006. **Resumos...** Florianópolis: SBPC, 2006, p. 63.

KONTEK, R.; MATLAWSKA-WASOWSKA, K.; KALINOWSKA-LIS, U.; BEATA MARCINIAK, B. Genotoxic effects of irinotecan combined with the novel platinum(II) complexes in human cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, 188:66–74, 2010.

KOPJAR, N.; ŽELJEŽIĆ, D.; VRDOLJAK, A.L.; RADIĆ, B. RAMIĆ, S.; MILIĆ, M.; GAMULIM, M.; PAVLACA, V.; FUČIĆ, A. Irinotecan toxicity to human blood cells in vitro: relationship between various biomarkers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 100:403–413, 2007.

LASKO, D.; CAVENEE, W.; NORDENSKJOLD, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annual Reviews Genetics**, 25:281-314, 1991.

LI, L.H.; FRASER, T.J.; OLIN, E.J.; BHUYAN, B.K. Action of camptothecin on Mammalian cells in culture. **Clinical Cancer Research**, 32:2643-2650, 1972

LISBOA, H.C.F.; BIASETTO, C.R.; MEDEIROS, J.B.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H. S.; TREVISAN, H.C. Avaliação da atividade esterase em fungos endofíticos. 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. São Paulo, 2002. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2002, p. 41

LUO, F.R.; PARANJPE, P.V.; GUO, A.; RUBIN, E.; SINKO, P. Intestinal transport of irinotecan in caco-2 cells and mdck ii cells overexpressing efflux transporters PGP, CMOAT, AND MRP1. **Drug Metabolism and Disposition**, 30:763–770, 2002.

MADHUSUDAN S.; HICKSON I.D.; DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. **Molecular Medicine**, 11:504-511, 2005.

MARKS, F.; MÜLLER-DECKER, K.; FÜRSTENBERGER, G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. **Toxicology**, 153:11-26, 2000.

MARSHALL. C.J. Tumor suppressor genes. **Cell**, 64:313-326, 1991.

MATHIJSSSEN, R.H.J.; ALPHEN, R.J.V.; VERWEIJ, J.; LOOS, W.J.; KEES NOOTER, K.; STOTER, G.; SPARREBOOM, A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). **Clinical Cancer Research**, 7:2182–2194, 2001.

MATUO, R.; HENRIQUES, G.A.P. **Avaliação da atividade citotóxica de 5-fluorouracil e seu metabólito fdump, e os sistemas de reparo envolvidos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 115p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

MOSESSO, P.; FONTI, E.; BASSI, L.; GARCIA, C.L.; PALITTI, F. The involvement of chromatin condensation in camptothecin induced chromosome breaks in G0 human lymphocytes. **Mutagenesis**, 14:103–105, 1999.

MOSESSO, P.; PICHIERRI, P.; FRANCHIOTTO, A.; PALITTI, F. Evidence that camptothecin-induced aberrations in the G2 phase of cell cycle of Chinese hamster ovary (CHO) cell lines is associated with transcription. **Mutation Research**, 452:189–195, 2000.

MÜLLER, H.J.; SCOTT, R. Hereditary conditions in which the loss of heterozygosity may be important. **Mutation Research**, 284:15-24, 1992.

NOZAWA, T.; MINAMI, H.; SUGIURA, S.; TSUJI, A.; TAMAI, I. Role of organic anion transporter oatp1b1 (oatp-c) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin: *in vitro* evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. **Drug Metabolism and Disposition**, 33:434–439, 2005.

O'REILLY, S.K.; ROWINSKY, E.K. The clinical status of irinotecan (CPT-11), a novel water soluble camptothecin analogue. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 24:47-70, 1996

OSMAN, F.; TOMSETT, B.; STRIKE, P. The isolation of mutagen-sensitive nuv mutants of *Aspergillus nidulans* and their effects on mitotic recombination. **Genetics**, 134:445-454, 1993.

PEDERSEN-BJERGAARD, J.; ROWLEY, J.D. The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. **Blood journal**, 83:2780-2786, 1994.

PFIZER. **Background document on the ugt1a1 polymorphisms and irinotecan toxicity: ACPS november 3, 2004 advisory committee meeting.** Disponível em: [www.fda.gov](http://www.fda.gov). Acesso em: 10, novembro, 2011.

PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A new method to detect potencial genotóxico agents using mitotic crossing over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal Genetics**, 17:371-376, 1994.

POMMIER, Y. Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, 4:429-434, 2004.

POMMIER, Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, biology and interfacial inhibition. **Chemical Reviews**, 109:2894–2902, 2009.

POMMIER, Y. Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins And Beyond. **Nature Reviews**, 6:789-802, 2006.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**. 17:421-433, 2010.

PONTECORVO, G.; KAFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. **Genetics**, 9:71-104, 1958.

REDINBO, M.R.; CHAMPOUX, J.J.; HOL, W.G.J. Novel Insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase i in complex with DNA. **Biochemistry**, 39:6832-6840, 2000.

RHEE, H.; PARK, H.J.; LEE, S.K.; LEE, C.; CHOO, H. P. Synthesis, cytotoxicity, and DNA topoisomerase II inhibitory activity of benzofuroquinolinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15:1651–1658, 2007.

RIBEIRO, R.L.; MARQUES, K.E. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: 2003. p. 21-26.

RIBAS, G.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Sister-chromatid exchanges (SCE) induction by inhibitors of DNA topoisomerases in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, 368:205-211, 1996.

ROBBINS W.A. Cytogenetic damage measured in human sperm following cancer chemotherapy. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 355:235-252, 1996.

ROPER, J.A. Production of heterozygous in filamentous fungi. **Experientia**, 8:14-15, 1952.

ROSSI, A.; ARST JR, H.N. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. **FEMS Microbiology Letters**, 66:51-54, 1990.

ROTHENBERG, M.L.; KUHN, J.G.; BURRIS, H.A.; NELSON, J.; ECKARDT, J.R.; TRISTAN-MORALES, M.; HILSENBECK, S.G.; WEISS, G.R.; SMITH, L.S.; RODRIGUEZ, G.I. Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. **Journal of Clinical Oncology**, 11:2194-2204, 1993.

ROY, S.K.; EASTMOND, D.A. Bimolane induces multiple types of chromosomal aberrations in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, 726:181– 187, 2011.

SEEDHOUSE, C.; RUSSELL, N. Advances in the understanding of susceptibility to treatment-related acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, 137:513–529, 2007.

SEGATO, F.; ROSSI, N.M.M. **Expressão gênica envolvida nos mecanismos de resistência à acriflavina, griseofulvina e terbinafina em fungos filamentosos.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Genética).

SORTIBRÁN, A.N.C.; TÉLLEZ, M.G.O.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerases I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, 604:83–90, 2006.

SOUZA-JUNIOR, S.A.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Chlorhexidine digluconate induces mitotic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Oral Diseases**, 11:146-150, 2005.

STERM, C. Somatic *crossing-over* and segregation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 21:625-730, 1936.

STEWART, L.; IRETON, G.C.; CHAMPOUX, J.J. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. **Journal of Molecular Biology**, 269:355-372, 1997.

STEWART, L.; REDINBO, M.R.; QIU, X.; WIN, G.J.H.; CHAMPOUX, J.J. A Model for the mechanism of human topoisomerase. **Science**, 279:1534-1541, 1998.

SUGINO, A.; HIGGINS, N.P.; COZZARELLI, N.R. DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage. **Nucleic Acids Research**, 8:3865-3874, 1980.

SWERDLOW, A.J.; HIGGINS, C.D.; SMITH, P.; CUNNINGHAM, D.; HANCOCK, B. W.; HORWICH, A.; HOSKIN, P.J.; LISTER, T.A.; RADFORD, J.A.; ROHATINER, A. Z.S.; LINCH, D.C. Second cancer risk after chemotherapy for Hodgkin's lymphoma: a collaborative British cohort study. **Journal of Clinical Oncology**, 29:4096-1404, 2011.

TAKIMOTO, C.H.; WRIGHT, J.; ARBUCK, S.G. Clinical applications of the camptothecins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1400:107-119, 1998.

TANIZAWA, A.; FUJIMORI, A.; FUJIMORI, Y.; POMMIER, Y. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. **Journal of the National Cancer Institute**, 86:836-842, 1994.

THAPA, U.; THAPA, P.; KARKI, R.; YUN, M.; CHOI, J.H.; JAHNG, Y.; LEE, E.; JEON, K.; NA, Y.; HA, E.; CHO, W.; KWON, Y.; LEE, E. Synthesis of 2,4-diaryl chromenopyridines and evaluation of their topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 1-9, 2011.

- TORRES, C.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. **Mutation Research**, 413:191–203, 1998.
- WANG, J.C. DNA Topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, 65:635-692, 1996.
- WANG, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 3:430–440, 2002.
- WANG, J.C. A journey in the world of DNA rings and beyond. **Annual Reviews Biochemistry**, 78:31–54, 2009.
- WANG, X.; WANG, L.K.; KINGSBURY, W.D.; JOHNSON, R.K.; HECHT, S.M. Differential effects of camptothecin derivatives on topoisomerase I-mediated DNA structure modification. **Biochemistry**, 37:9399-9408, 1998.
- YAMADA, T.; SHINOHARA, K.; TAKEDA, K.; KAMEI, N.; KATSUKI, K.; ARIYOSHI, K.; KAMEI, T. Second lung adenocarcinoma after combination chemotherapy in two patients with primary non-Hodgkin's lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, 29:226-228, 1999.
- YOUNG, B.D.; DEBERNARDI, S.; LILLINGTON, D.M.; SKOULAKIS, S.; CHAPLIN, T.; FOOT, N.J.; RAGHAVAN, M. A role for mitotic recombination in leukemogenesis. **Advances Enzyme Regulation**, 46:90–97, 2006.
- ZHANG, H.; BARCELÓ, J.M.; LEE, B.; KOHLHAGEN, G.; ZIMONJIC, D.B.; POPESCU, N.C.; POMMIER, Y. Human mitochondrial topoisomerase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98:10608–10613, 2001.
- ZHANG, H.; MENG, L.; ZIMONJIC, D.B.; POPESCU, N.C.; POMMIER, Y. Thirteen-exon-motif signature for vertebrate nuclear and mitochondrial type IB topoisomerases. **Nucleic Acids Research**, 32:2087-2092, 2004.
- ZIMMERMANN, F.K.; SCHWAIER, R.; LAER, U. Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrosamides. **Zeitschrift Für Vererbungslehre**, 98:230-246, 1966.