



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Toxicidade do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina: um estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico empregando diferentes modelos biológicos

Dissertação de Mestrado

Julia Vanini

**Porto Alegre
2022**

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

Toxicidade do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina: um estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico empregando diferentes modelos biológicos

JULIA VANINI

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, outubro de 2022

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da dissertação aqui apresentada foi redigida seguindo as orientações do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Science and everyday life cannot and should not be separated.

Rosalind Franklin

Dedico este trabalho à minha família que me apoiou e esteve ao meu lado durante toda essa caminhada árdua e gratificante. Sem vocês nada disso seria possível.

Amo vocês de outras vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. João Antônio Pêgas Henriques pelo suporte desde o início do mestrado e pela oportunidade única de ser orientada por um profissional de renome dentro da ciência. Tenho muito orgulho e alegria de ter desenvolvido essa etapa importante de minha vida sob orientação de uma pessoa tão fantástica e com um coração gigante. Obrigada professor por ser um exemplo de cientista e ser humano para mim e para todos ao seu redor!

Agradeço de uma forma inenarrável ao Dr. Iuri Marques de Oliveira por todos os ensinamentos técnicos e teóricos o quais foram aplicados nesse estudo. Obrigada pelo apoio desde o início se mostrando um excelente cientista e por ser um amigo o qual compartilhei tantas risadas dentro e fora do laboratório. Que nossa amizade perdure.

Aos meus colegas de laboratório André e Jéssica por me ensinarem técnicas e pelos diversos momentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas as quais fiz parte e que foram de extrema importância para meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Felipe Klein Ricachenevsky por aceitar o convite de fazer parte da minha comissão de acompanhamento.

A Silvia Regina Centeno que antes mesmo da minha aprovação na seleção esteve presente me ajudando nas questões burocráticas e sempre disposta a sanar minhas dúvidas. Obrigada Silvia pelo teu profissionalismo e carinho pelo que você faz. Não tenho dúvidas que seu trabalho exemplar é um dos motivos da excelência do PPGBCM. Você é uma pessoa maravilhosa e não tenho palavras para agradecer toda sua ajuda.

A Universidade Federal do Rio Grande de Sul e o Centro de Biotecnologia por me proporcionarem crescimento profissional e pessoal por meio do mestrado apresentando o ensino público de extrema qualidade. Obrigada a todos os envolvidos que tonaram possível a excelência do PPGBCM.

Por fim, agradeço especialmente a minha família por apoiarem os sonhos de uma jovem cientista. Minha mãe Ana Paula Scalon, meu pai Leandro José Vanini e minha irmã Juliandra Vanini. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por serem meu porto seguro em todos os momentos, principalmente naqueles em que nem eu mesma acreditava na minha capacidade. Se me perguntassem qual foi meu maior desafio durante essa jornada, não hesitaria por um segundo em responder que foi ficar longe de vocês. Vocês são tudo para mim e eu nunca vou ter palavras para descrever a gratidão e o amor que tomam conta do meu coração quando penso em vocês. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
1. Ácido valproico	15
2. Ácido valproico e câncer	17
2.3 Glioblastoma multiforme	21
2.4 Utilização do AV no tratamento de glioblastoma multiforme	24
3. Moléculas derivadas do ácido valproico.....	26
4. Magnésio	30
4.1 Compostos contendo magnésio derivados do ácido valproico.....	32
5 Modelos biológicos empregados neste estudo	34
5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
5.1.1 Vias de reparação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
5.2 Fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79)	40
5.3 Linhagens celulares de glioblastoma multiforme utilizadas neste estudo.....	41
OBJETIVOS.....	43
Objetivo geral.....	43
Objetivos específicos.....	43
CAPÍTULO I.....	44

CAPÍTULO II.....	45
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	55
Conclusão geral.....	55
Conclusões específicas	55
PERSPECTIVAS.....	56
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AV: Ácido Valproico

BER: *Base Excision Repair*. Reparação por Excisão de Bases

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK: Proteína Cinase Dependente de DNA

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GABA: *Gamma-AminoButyric Acid*. Ácido Gama-Aminobutírico

GBM: Glioblastoma multiforme

HDAC: *Histone Deacetylases*. Desacetilase de Histonas

HR: *Homologous Repair*. Reparação Homóloga

MGMT: Metilguanina metiltransferase

NER: *Nucleotide Excision Repair*. Reparação por Excisão de Nucleotídeos

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*. Reparação por Recombinação Não-Homóloga

OMS: Organização Mundial da Saúde

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue*. Fosfatase homóloga à tensina

SNC: Sistema nervoso central

TLS: *Translesion Synthesis*. Síntese de Translesão

TMZ: Temozolamida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido valproico e valproato de sódio.....	14
Figura 2: Estrutura química do complexo metálico $[Mg(Valp)_2Phen]$	31
Figura 3: Agentes nocivos ao DNA que causam danos ao DNA e mecanismos de reparação responsáveis pela remoção das lesões.....	33
Figura 4: Mecanismos envolvidos na toxicidade do valproato de sódio e $[Mg(Valp)_2Phen]$	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais proteínas do sistema BER, NER, HR, NHEJ, PRR e TLS em <i>S. cerevisiae</i>	35
Tabela 2. Caracterização das diferentes linhagens celulares de glioblastoma multiforme empregadas nesse estudo.....	39

RESUMO

O ácido valproico (AV) é um medicamento amplamente utilizado no tratamento de doenças neurológicas como epilepsia, transtorno bipolar e esquizofrenia. Devido a descoberta de seu potencial inibidor de histonas desacetilases (HDAC), o AV tem sido objeto de estudos relacionados a terapia anticâncer. Entretanto, uso do AV possui limitações por ocasionar toxicidade sistêmica. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais de medicamentos já utilizados na clínica. Partindo do princípio econômico e em agilidade, novas drogas desenvolvidas a partir de moléculas pré-existentes se torna uma estratégia mais eficaz. Dessa forma, no presente trabalho foi analisado o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico bem como as vias de reparação de DNA envolvidas na resposta ao dano induzido pelo complexo de magnésio à base de ácido valproico com 1,10-fenantrolina - [Mg(Valp)₂Phen] - utilizando células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês V79, células de glioblastoma multiforme (M059J, U87MG e U251MG) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que complexo [Mg(Valp)₂Phen] apresenta maior efeito citotóxico do que o valproato de sódio em células V79, gliomas e levedura. Esse efeito está possivelmente ligado a capacidade de intercalação do complexo de magnésio identificada pelo teste de dicroísmo circular. A capacidade de se intercalar no DNA induz alterações na dupla hélice que podem levar a quebras no DNA, como verificado no ensaio cometa e teste de micronúcleos, mutações frameshift e pontuais visto em leveduras e a morte celular. Os danos induzidos pelo [Mg(Valp)₂Phen] são reparados pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR), recombinação não homóloga (NHEJ) e síntese translesão (TLS), como identificado em leveduras pela diferença na sobrevivência de linhagens proficientes e deficientes nessas vias. Ainda, pode ser observado que aparentemente a via de reparo por excisão de bases (BER) contribui na toxicidade do complexo. Por fim, constatou-se a seletividade do complexo a medida que esse se mostrou mais citotóxico e genotóxico nos gliomas do que na célula não tumoral de fibroblasto de pulmão humano (MRC5), indicando perspectivas terapêuticas interessantes. Dessa forma, nosso estudo apresenta dados pioneiros e relevantes que sugerem a potencial aplicação do complexo [Mg(Valp)₂Phen] como agente citotóxico.

ABSTRACT

Valproic acid (VA) is a drug widely used in the treatment of neurological diseases such as epilepsy, bipolar disorder and schizophrenia. Due to the discovery of its potential to inhibit histone deacetylases (HDACs), VA has become the subject of studies related to anticancer therapy. However, the use of VA has limitations because it causes systemic toxicity. Therefore, the development of new drugs is necessary in order to reduce the side effects of drugs already used in the clinic. Based on the principle of economy and agility, new drugs developed from pre-existing molecules becomes a more effective strategy. Thus, in the present work we analyzed the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential as well as the DNA repair pathways involved in the response to damage induced by the magnesium complex based on valproic acid with 1, 10-phenanthroline - [Mg(Valp)₂Phen] - using Chinese hamster lung fibroblast V79 cells, glioblastoma multiforme cells (M059J, U87MG and U251MG) and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that [Mg(Valp)₂Phen] complex exhibits greater cytotoxic effect than sodium valproate on V79 cells, gliomas and yeast. This effect should be due to the ability of the magnesium complex to intercalate into DNA inducing changes in the double helix that can lead to DNA breaks, observed by comet assay and micronucleus test, *frameshift* and point mutations, as seen in yeast, and cell death. The damage induced by [Mg(Valp)₂Phen] is repaired by the nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), nonhomologous end joining (NHEJ), and translesion synthesis (TLS) pathways, as identified in yeast by the difference in survival of strains proficient and deficient in these pathways. Also, it can be observed that apparently the base excision repair (BER) pathway contributes to the toxicity of the complex. Finally, we observed the selectivity of the complex as it was more cytotoxic and genotoxic in gliomas than in the non-tumor human lung fibroblast cell (MRC5), indicating interesting therapeutic perspectives. Thus, our study presents pioneering and relevant data indicating the potential application of the complex [Mg(Valp)₂Phen] as a cytotoxic agent.

INTRODUÇÃO

1. Ácido valproico

O ácido valproico (2-propil-pentanóico, AV) é um ácido graxo de cadeia curta ramificada com estrutura molecular simples consistindo em dois grupos propil ligados a uma fração de ácido acético (TOMSON et al., 2016), sendo empregado normalmente na forma salina de valproato de sódio (Fig. 1). O AV é um composto amplamente utilizado para o tratamento de doenças como epilepsia, bipolaridade e esquizofrenia devido a seu potencial anticonvulsivante e suas propriedades estabilizadoras de humor (BIALER, 2012; CHATEAUVIEUX et al., 2010).

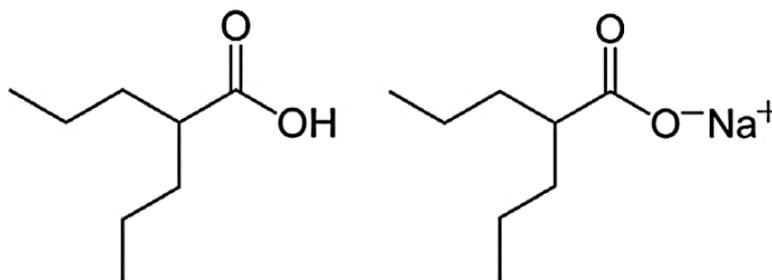


Figura 1. Estrutura química do ácido valproico e valproato de sódio (CHATEAUVIEUX et al., 2014).

As propriedades anticonvulsivantes, estabilizadoras de humor e neuroprotetoras do AV envolvem diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, a modulação pré e pós-sináptica do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Essa modulação pode ampliar a atividade inibitória do GABA, por aumentar a sua disponibilidade na sinapse e atuar diretamente nos receptores gabaérgicos (ROMOLI et al., 2019). Além disso, o AV atua bloqueando os canais de cálcio, de modo a reduzir a despolarização

neuronal e inibir canais de sódio dependentes de voltagem (SZULCZYK & NUROWSKA, 2017). Entretanto, o uso do AV, isolado ou combinado com outros medicamentos, no tratamento de diferentes doenças que acometem o sistema nervoso central apresenta algumas restrições devido a efeitos colaterais importantes (MEKKONEN, 2019).

O AV também é um inibidor competitivo de HDACs de classes I e II, evitando a ligação do substrato e, conseqüentemente reduzindo a atividade dessas enzimas (SIXTO-LÓPEZ et al., 2020), podendo induzir alteração na expressão gênica de diferentes alvos moleculares pelo remodelamento da cromatina (MISHRA et al., 2021). Essa capacidade de inibir HDACs tem participação importante no seu efeito teratogênico (KOWALSKI et al., 2022). Desta forma, o AV está relacionado a diversas malformações do sistema nervoso central como exencefalia, dilatação do sistema ventricular, espinha bífida, anencefalia, dentre outras (TUNG & WINN, 2010; MANTHOU et al., 2020). Além disso, alterações cardíacas congênitas vêm sendo associadas ao uso do AV em estudos pré-clínicos onde o aumento significativo das cardiopatias é considerado dose dependente. Dentre as cardiopatias citadas, as mais caracterizadas são defeitos do septo interventricular e atrial, além de interferência em aspectos cardíacos funcionais como contratilidade (WU et al., 2010; PHILBROOK et al., 2019).

O efeito do AV como um inibidor de HDACs despertou o interesse no estudo da sua utilização em terapias anticâncer devido às suas propriedades epigenéticas antitumorais. Assim, os efeitos antiproliferativos do AV foram observados em diferentes tipos de câncer, como de mama, próstata, pulmão e gliomas (WAWRUSZAK et al., 2021; TRAN et al., 2019; KALANTAR et al., 2021; RIVA et al., 2018).

2. Ácido valproico e câncer

2.1 O câncer

O câncer é uma doença de alta complexidade patológica e apresenta diferentes estágios em seu desenvolvimento. A evolução se inicia a partir de mutações genéticas, sejam elas espontâneas ou induzidas, pró-tumorigênicas que ocorrem em uma célula normal gerando uma célula mutante adaptada ao microambiente ao qual está localizada e capaz de produzir clones (CURTIUS et al., 2018). Alterando a homeostase, os processos regulatórios de proliferação e morte celular, as células cancerosas se proliferam rapidamente de modo a invadir tecidos adjacentes induzindo angiogênese e posteriormente processo metastático (MARONGIU et al., 2018; HANAHAN & WEINBERG, 2011; DIORI KARIDIO & SANLIER, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é um grupo de doenças que podem acometer diferentes órgãos e tecidos a partir de uma célula anormal com crescimento não controlado. Essa ainda é a segunda principal causa de morte no mundo com cerca de 9,6 milhões de morte em 2018, sendo que de 30 a 50% dos casos de câncer poderiam ser prevenidos. Além disso, a incidência e a mortalidade do câncer são altamente oscilantes uma vez que os países possuem características socioeconômicas e de estilo de vida heterogêneas (BRAY et al., 2018).

A terapêutica anticâncer se baseia frequentemente em uma tríade composta por ressecção cirúrgica, quimioterapia e/ou radioterapia. Em adição, novas terapias como imunoterapia, anticorpos monoclonais, identificação de proteínas, aspectos epigenéticos,

terapia gênica, dentre outras, são consequências do avanço científico e tecnológico que permitiram o aumento da expectativa de vida para pacientes com câncer (SAINI & SHARMA, 2018; DEBELA et al., 2021, ZAIMY et al., 2017). Contudo, nenhuma estratégia terapêutica superou a eficiência e emprego da quimioterapia padrão.

A quimioterapia é baseada no uso de agentes que exercem uma ação antiproliferativa, referindo-se à erradicação das células malignas em função da inibição no desenvolvimento celular. Esse efeito é desempenhado por vários mecanismos atuantes em processos de sinalização intracelular, na homeostase iônica, alteração na permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial e geração de lesões ao DNA. Esses fenômenos são capazes de ativar os mecanismos de morte celular programada, em seus mais diversos tipos (LIVSHITS et al., 2014).

No entanto, há várias restrições na quimioterapia, como a quantidade limitada de droga que pode ser administrada ao paciente, pois a maioria dos quimioterápicos não tem especificidade para um único tipo celular e não destroem células de forma seletiva e exclusiva, de maneira a afetar também células normais, podendo levar a uma toxicidade sistêmica (LI et al., 2020). Portanto, a busca por novas moléculas antitumorais, que sejam mais seletivas e possam apresentar menores efeitos colaterais aos pacientes, é fundamental para que estes possam ter uma melhor qualidade de vida.

Entretanto, a elucidação dos mecanismos associados à ação desses fármacos em sua forma isolada ou combinados, à resistência as drogas antitumorais, sejam estas convencionais ou experimentais, é de elevada importância para o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento quimioterápico.

2.2 Emprego do AV na terapia anticâncer

Buscando novas alternativas de moléculas para o tratamento anticâncer, foi demonstrado que o AV possui atividade antitumoral em diversos tipos de câncer. Nesse sentido, Wawruszak et al. (2021) demonstraram através de uma revisão minuciosa a participação do AV no tratamento de câncer de mama em terapias combinadas e monoterapia. Os mecanismos de ação do AV no câncer de mama incluem indução de apoptose, diminuição da proliferação e viabilidade celular e parada do ciclo celular. Por outro lado, o AV quando testado em linhagens celulares de câncer gástrico demonstrou inibir crescimento celular pela redução da expressão de HDAC1 e HDAC2 com aumento dos níveis de acetilação de histonas H3 e H4 e induziu autofagia e apoptose via HDAC1/PTEN/Akt (SUN et al., 2020). Ainda, quando utilizado em estudos de câncer de próstata, o AV é capaz de induzir mudanças no padrão de proliferação celular e expressão gênica por meio da superregulação de TSP1, uma proteína capaz de inibir proliferação, migração e angiogênese comumente pouco expressa em casos de progressão do câncer de próstata (CHELLURI et al., 2016).

O AV é também utilizado combinado com outros compostos visando seu papel como possível quimiossensibilizador. Dessa forma, o AV foi capaz de sensibilizar células de gliomas à luteolina, um flavonoide encontrado em plantas medicinais, potencializando o efeito antitumoral desse composto pela indução de apoptose e autofagia pela via de sinalização Akt (HAN et al., 2021). Além disso, esse mesmo efeito sensibilizador do AV pode ser observado em células de melanoma droga resistentes tratadas previamente com baixas doses de AV por 24 h e posteriormente expostas a radiação. Essas células apresentaram aumento de morte celular que pode ser explicada pelo mecanismo inibitório

de HDAC2 do AV, o qual aumenta a acetilação de histonas resultando em uma configuração de cromatina aberta de forma que essa é mais acessível a agentes citotóxicos deixa as células mais suscetíveis a morte celular pelo tratamento de radioterapia (KALAL et al., 2019). Ainda, o tratamento com AV em linhagens celulares de carcinoma espinocelular de esôfago humano (TE9, TE11 e KES) aumenta a sensibilidade tumoral à radioterapia através da inibição das vias de reparo de recombinação homóloga e não homóloga e consequentemente impedindo o processo de reparo de quebra de fita dupla (MAKITA et al., 2015).

A interação do AV com a cromatina e consequente modificação na expressão gênica em astrócitos e neurônios, abre um amplo campo de estudo sobre a utilização desse composto de forma isolada ou combinada em novas abordagens quimioterápicas vantajosas para cânceres de cabeça e pescoço, dentre esses os gliomas que apresentam um prognóstico pobre (LENG et al., 2016; FAY et al., 2016). Han e Guan (2021) demonstraram os diferentes usos do AV de forma isolada e em terapias combinadas no tratamento de gliomas. Nesse sentido, a monoterapia utilizando AV é capaz de inibir proliferação celular, migração e invasão tumoral além de induzir autofagia, apoptose e parada do ciclo celular envolvendo diferentes alvos como Akt/mTOR, fator de crescimento endotelial vascular, caspases e Bax. (HAN et al., 2020; KAVALIAUSKAITĖ et al., 2017). O AV também vem sendo associado ao aumento de sobrevida de pacientes diagnosticados com glioblastoma quando integrante do tratamento padrão descrito. Entretanto, um viés como a idade deve ser considerado para tal afirmação necessitando assim maior investigação para validação de tal êxito (LU et al., 2018).

2.3 Glioblastoma multiforme

Glioblastomas multiforme (GBM) são tumores primários malignos do sistema nervoso central de maior prevalência classificados, segundo a OMS em 2016, como grau IV em uma escala de malignidade (LOUIS et al., 2016). A origem desses tumores se dá a partir de células gliais, podendo ainda ser derivado de pequenos conjuntos de célula tronco e progenitoras neurais adultas (WIRSCHING et al., 2016). Além disso, os riscos do desenvolvimento de glioblastomas são pouco definidos, uma vez que apenas pacientes com histórico de doenças genéticas, como neurofibromatose, esclerose tuberosa e retinoblastoma, apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento do tumor. Entretanto, cerca de 1% dos pacientes acometidos apresentam histórico de doenças hereditárias deixando lacunas no entendimento dessa doença (DAVIS, 2016).

Os GBM são um dos tumores mais agressivos do grupo dos gliomas, sendo classificados como isocitrato desidrogenase selvagens (wildtype), do inglês “*Isocitrate dehydrogenase*” (IDH) ou mutantes e tumores não específicos, do inglês “*not otherwise specified*” (NOS). Os GBM IDH-wildtype são aqueles tumores os quais não apresentam mutações nos genes que codificam a isocitrato desidrogenase 1 e 2. Oposto a isso, glioblastomas classificados como IDH-mutante são aqueles que apresentam características moleculares de mutação nesses genes codificadores da proteína. Os tumores classificados como NOS, são aqueles que não se enquadram em nenhuma das categorias definidas (LOUIS et al., 2016; WIRSCHING et al., 2016).

A maioria dos GBM são classificados como IDH-wildtype, o que faz com que novos marcadores moleculares sejam necessários para a caracterização molecular a fim de obter um melhor prognóstico e novas perspectivas para terapias individuais

considerando sua heterogeneidade genética que contribui para o baixo êxito nas terapêuticas utilizadas (LIU et al., 2019). Em adição, a caracterização genômica e fenotípica de diferentes tumores é de extrema importância, uma vez que GBM apresenta diferentes vias gênicas envolvidas no seu desenvolvimento. Sendo assim, Vaubel et al., (2020) demonstrou a importância do avanço de pesquisas envolvendo painéis que caracterizam molecularmente diferentes tipos de GBM provenientes de pacientes, sendo que esses dados podem ser usados em pesquisas clínicas aumentando as chances de uma resposta terapêutica positiva e direcionando terapias específicas para tumores de diferentes vulnerabilidades terapêuticas.

A terapêutica aplicada para GBM consiste inicialmente em ressecção cirúrgica, a qual auxilia no diagnóstico final, reduz sintomas no quadro do paciente e é de grande importância uma vez que a precisão da ressecção interfere diretamente na sobrevivência do paciente (BATASH et al., 2017). Entretanto, apenas a cirurgia não é o suficiente para melhorar o prognóstico dos pacientes devido a impossibilidade da retirada total do tumor em decorrência da infiltração tumoral. Dessa forma, terapias combinadas de quimioterapia e radioterapia são aplicadas à medida que o quadro diagnóstico é elucidado. A quimioterapia padrão indicada para GBM é composta por temozolamida, medicamento o qual é administrado oralmente diariamente durante seis semanas geralmente em concentrações de 75 mg/m² juntamente com sessões de radioterapia e posterior aumento de dose com intervalos maiores de administração (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015; BATASH et al., 2017; BEI et al., 2010).

Pacientes com GBM apresentam uma taxa de sobrevivência reduzida seguindo o protocolo padrão de tratamento ou combinações específicas de medicamentos

quimioterápicos disponíveis atualmente, sendo a média de tempo de sobrevivência de 12 meses após o diagnóstico (WITTHAYANUWAT et al., 2018; STOYANOV et al., 2018; BEI et al., 2010; YANG et al., 2014). Dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas e maior precisão e extensão da ressecção cirúrgica vem aumentando na tentativa de aumentar a sobrevida de pacientes acometidos por essa doença (REVILLA-PACHECO et al., 2021).

A heterogeneidade intertumoral e intratumoral encontrada em casos de glioblastoma multiforme dificulta o êxito das terapias. Sendo assim, novos testes e marcadores biológicos vem sendo utilizados para entender a biologia molecular particular de cada tumor. Dentre os testes aplicados recentemente está o sequenciamento de célula única, o qual permite uma análise mais minuciosa e precisa de cada célula tumoral permitindo a caracterização tumoral completa (HWANG et al., 2018). Além disso, o Atlas do Genoma do Câncer é uma importante ferramenta da bioinformática para o estudo e compreensão do perfil genômico de tumores (TOMCZAK et al., 2015). No caso de GBM, esses são ainda classificados em mesenquimais, clássicos, proneurais e neurais de acordo com biomarcadores genéticos e epigenéticos. Os mesenquimais são aqueles que apresentam mutação no gene supressor de tumor NF1 (Neurofibromatose tipo 1), enquanto clássicos são aqueles caracterizados pela amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico. Já os classificados com proneurais são associados a mutações no gene P53 e os neurais apresentam características que envolvem um amplo conjunto de genes (VERHAAK et al., 2010).

Dentre os fatores complicadores para o tratamento de GBM, se tem ainda a resistência tumoral. Essa pode ser consequência de diversos mecanismos moleculares

envolvidos na tumorigênese. Dentre esses, a metil guanina metil transferase (MGMT) é uma enzima crucial envolvida no reparo de DNA. Uma vez que o mecanismo de ação da TMZ compreende a transferência de grupos metil para o DNA e a MGMT age revertendo esse processo, a resistência tumoral é ampliada. Sendo assim, o estado de metilação do promotor de MGMT, bem como os níveis de expressão da proteína, são importantes clinicamente para determinação das terapias a serem empregadas (JOHANNESSEN et al., 2012; TAN et al., 2020). Além disso, mecanismos como reparo por excisão de base, reparo de mal pareamento de DNA e alterações epigenéticas também contribuem para a resistência tumoral e interferem na resposta ao tratamento, culminando na necessidade do desenvolvimento de novas terapias (WU et al., 2021; JOHANNESSEN et al., 2012).

2.4 Utilização do AV no tratamento de glioblastoma multiforme

Pacientes diagnosticados com GBM apresentam convulsões recorrentes e necessitam de medicamentos para o controle desse sintoma. Dentre os fármacos prescritos no tratamento medicamentoso aplicado a essa doença, está o AV como primeira opção pelo seu potencial anticonvulsivante (KERKHOF et al., 2013). Estudos sobre aumento da taxa de sobrevivência de pacientes que recebem o tratamento padrão de ressecção cirúrgica e radioquimioterapia concomitantemente com o uso do AV tem demonstrado resultados promissores (TSAI et al., 2012). Yuan et al. (2014) desenvolveu uma metanálise envolvendo 1634 indivíduos diagnosticados para GBM sugerindo que o uso do AV durante o tratamento pode aumentar a sobrevida dos pacientes em comparação com aqueles que não utilizam fármacos antiepilépticos ou utilizam outra droga que não seja o AV.

O AV tem sido amplamente avaliado em estudos *in vitro* para compreender os mecanismos de ação e avaliar a possível empregabilidade desse fármaco em terapias anticâncer, incluindo aquelas direcionadas para GBM. Nesse sentido, Tseng et al., (2017) demonstraram a redução da proliferação celular de linhagens de GBM quando expostas ao AV por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos níveis de proteínas antioxidantes, além da indução de parada do ciclo celular de forma dose dependente. Esses dados são coerentes com o estudo realizado por Das et al., (2007) que mostrou atividade citotóxica e antiproliferativa do AV em células de GBM de forma isolada e combinado com outras drogas como etoposídeo. Portanto, quando utilizado em combinações farmacológicas, o AV tem demonstrado capacidade de sensibilizar células tumorais de GBM e potencializar a atividade antitumoral de drogas como 3-bromopiruvato e etoposídeo (ISHIGURO et al., 2018; DAS et al., 2007). Além disso, estudos envolvendo terapias padrões para GBM como quimioterapia baseada em temozolamida e radioterapia mostraram que o uso do AV pode ser um componente promissor no tratamento de GBM uma vez que células tumorais apresentaram maior sensibilidade as opções terapêuticas padrões aumentando a indução de apoptose através da regulação redox e atividade inibitória de HDAC (CHEN et al., 2011; CHIE et al., 2015).

Ainda que promissores, os resultados obtidos até o momento para o uso do AV em GBM são em sua grande maioria produtos de testes *in vitro*, o que exige cautela quando se fala na aplicação clínica. Nesse contexto, Berendsen et al., (2019) apresentou dados importante quanto ao uso do AV em GBM *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* mostraram o aumento da acetilação de histona H3 e H4, enquanto testes utilizando tecidos

provenientes de pacientes com GBM e tratados com AV não apresentaram o mesmo padrão de acetilação. Essa diferença poderia ser explicada pelos níveis teciduais, incluindo tecido cerebral, do AV que são quase 10 vezes menor que as concentrações avaliadas *in vitro*. Desafios como resistência medicamentosa e barreira hematoencefálica ainda precisam ser superados para maior efetividade no tratamento de GBM (OU et al., 2020). Nesse sentido, discussões e estudos sobre a real eficácia e empregabilidade do AV em GBM são essenciais.

3. Moléculas derivadas do ácido valproico

Efeitos adversos graves do uso contínuo de produtos farmacêuticos, incluindo o AV, possuem baixa incidência e são limitados a um grupo específico de pacientes. Entretanto, efeitos colaterais são capazes de causar danos de alto impacto à saúde do paciente necessitando cautela na aplicação clínica (STAR et al., 2014). Dentre as reações adversas causadas pelo AV a hepatotoxicidade é a mais apontada, sendo a insuficiência hepática de evolução crônica com encefalopatia hepática a mais frequente. A hepatotoxicidade é associada ao efeito inibitório do AV na via de β -oxidação mitocondrial, por indução de efeitos metabólicos e a sua metabolização pelo complexo enzimático citocromo P50 formando dois metabólitos (4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato) hepatotóxicos (NANAU & NEUMAN, 2013; VIDAURRE et al., 2017; NEUMAN et al. 2001). Em adição, o uso do AV pode induzir a ocorrência de doenças hematológicas, tais como hipofibrinogenemia e trombocitopenia, sendo essa a mais comum e afetando mais frequentemente crianças, pois normalmente são tratadas com AV em doses mais elevadas do que em adultos (VERROTTI et al., 2014).

Diversos fármacos são contraindicados, dentre esses o AV, durante o período gestacional e para mulheres em idade fértil devido a teratogenicidade associada que pode levar a consequências potencialmente fatais. Além disso, clinicamente em terapias antitumorais, o AV, quando em monoterapia, necessita ser administrado em altas doses para uma boa eficácia, o que não é possível considerando a segurança farmacológica indispensável. Dessa forma, o AV é mais comumente administrado de forma sinérgica com outras drogas quimioterápicas atuando como sensibilizador em células tumorais (ATMACA et al., 2007). Portanto, torna-se necessária e importante a síntese de novos compostos para fim de minimizar reações adversas, obter maior eficácia em baixas doses medicamentosas e conseqüentemente maior segurança clínica (TUNG & WINN, 2010).

Devido a simplicidade estrutural molecular do AV, se torna uma molécula de partida promissora, considerando ainda seu baixo custo financeiro e disponibilidade, para síntese de novos compostos derivados tendo como alvo o sistema nervoso central (SNC). O desenvolvimento de derivados e alterações químicas do AV, como valrocemide e isovaleramide, tem demonstrado resultados favoráveis no tratamento de diferentes doenças neurológicas como epilepsia, bipolaridade e dores neuropáticas (MAREŠ et al., 2013; BIALER & YAGEN, 2007). Por outro lado, a síntese de derivados a partir do AV tem por objetivo eliminar efeitos teratogênicos decorrentes do uso do AV e aumentar a eficácia medicamentosa para o tratamento de doenças neurológicas com a vantagem de possuir informações sobre os problemas farmacocinéticos, toxicológicos e farmacodinâmicos associados ao medicamento original (BIALER & YAGEN, 2007). Nesse sentido, EYAL e colaboradores (2005) avaliaram cinco derivados do AV (ácido valnóico, ácido propilisopropilacético, ácido disopropilacético, ácido ciclopropilacético

e ácido tetrametilciclopropanocarboxílico) e seus subprodutos quanto ao potencial de desacetilação de histonas e citotoxicidade em linhagens de melanoma e de câncer de cólon (EYAL et al., 2005). Neste estudo, todos os derivados analisados apresentaram efeitos citotóxicos inferiores aos demonstrados pelo AV. No entanto, quanto à propriedade de desacetilação de histonas, os derivados não mostraram atividade superior ao AV, o que sugere que o AV apresenta um melhor desempenho como agente antitumoral em relação às moléculas derivadas (EYAL et al., 2005). Existem outros exemplos, como valnoctamida, diisopropilacetamida, valroцемida (valproilglicinamida), N-2,2,3,3-pentametil ciclopropano carboxamida, 2,2,3,3-tetrametil ciclopropil carbonil ureia, isovaleramida (NPS-1776) e o ácido arundico, que possuem efeitos menos citotóxicos e mais eficientes que o AV em si. Também, além de ser um medicamento epiléptico efetivo, o AV inibe a angiogênese tanto *in vitro* como *in vivo* (EL-FAHAM et al., 2014). Importante ressaltar, que entre os novos compostos sintetizados, tem-se o aumento da associação de metais a moléculas orgânicas buscando maior citotoxicidade que varia de acordo com o tipo de célula estudada (IBRAHIM et al., 2020).

A química biológica de complexos metálicos já se mostrou de grande interesse para o desenvolvimento de novas drogas e atualmente é considerada como uma das mais promissoras áreas para desenvolvimento de novos quimioterápicos. Os metais podem coordenar ligações em configurações tridimensionais precisas, permitindo, assim, a “montagem” de moléculas que reconheçam e interajam com alvos moleculares específicos (MEGGERS, 2009). Além disso, os complexos metálicos sofrem facilmente reações redox e substituição de ligações, o que lhes permite interagir mais eficientemente com moléculas biológicas. O estudo de derivados organometálicos está focado em

complexos biologicamente ativos formados por íons essenciais, como o cobre e o magnésio. Portanto, a escolha de íons metálicos para compor novos fármacos é devido a sua capacidade de interagir mais ativamente com alvo biológicos específicos, sua toxicidade ao organismo quando fora de sua via metabólica e diferentes conformações que permitem distribuições espaciais adequadas de diferentes ânions e ligantes (ALAMA et al., 2009).

Tendo como objetivo terapias anticâncer, derivados do AV contendo metais demonstram maior toxicidade que o AV por si quando testados em células tumorais. Nesse sentido, o pró-fármaco de platina (IV) diaminediclorodihidroxiplatina conjugado com valproato apresentou maior citotoxicidade em células de carcinoma *in vitro* e apesar de não gerar parada no ciclo celular, promove apoptose nas células cancerígenas. Além disso, quando testado *in vivo* para carcinoma de pulmão em ratos, mostrou capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral com diminuição da nefrotoxicidade (YANG et al., 2012).

O complexos metálicos contendo ions de zinco (Zn) - $[Zn(Valp)_2Bipy]$ e $[Zn(Valp)_2(Nic)_2]$ – induziram maior citotoxicidade, parada no ciclo celular e apoptose em células tumorais de câncer de pulmão (A549) *in vitro* do que o valproato de sódio (SILVA et al., 2021). Ainda, $[Zn(Valp)_2Bipy]$ apresenta maior efeito anticonvulsivante em peixes zebra adultos do que o AV e outros compostos metálicos como $[Zn(Valp)_2Phen]$, $[Cu(Valp)_2Phen]$ e $[Cu(Valp)_2Bipy]$. Entretanto, os derivados $[Cu(Valp)_2Phen]$ e $[Cu(Valp)_2Bipy]$ se mostraram mais tóxicos quando testados em embriões da mesma espécie atrasando a eclosão e desenvolvimento (GRÜNSPAN et al., 2018). Derivados metálicos contendo íons de cobre como $[Cu(Valp)_2Phen]$, foram

descritos pela sua capacidade anticonvulsivante superior ao AV quando testado em ratos sem aumento de toxicidade (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009). Entretanto, a adição de cobre e os ligantes fenentrolina e bipyridina ao AV, resultando em derivados $[Cu(Valp)_2Phen]$, $[Cu(Valp)_2Bipy]$ e $[Cu_2(Valp)_4]$, induziu em *Saccharomyces cerevisiae*, aumento da citotoxicidade quando comparado ao valproato de sódio. Além disso, induziu danos no DNA que levaram ao recrutamento de diferentes vias de reparação do DNA, sendo este um aspecto relevante para a aplicabilidade farmacológica de novas moléculas com potencial antitumoral (RODRIGUES et al., 2021). Ainda, destaca-se a presença de 1,10-fenentrolina e bipyridina nas moléculas, pois a inclusão de ligantes em compostos metálicos farmacologicamente ativos, como por exemplo, medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais e antitumorais, tem mostrado resultados importantes na melhoria da eficácia terapêutica destes agentes (para revisão, ver SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009; SANTINI et al., 2014).

O magnésio (Mg) também é capaz de formar complexos estáveis com o AV. Desta forma, derivados do AV contendo íons de magnésio também vem sendo estudados.

4. Magnésio

O Mg é o quarto mineral essencial mais abundante no corpo humano distribuído em diferentes tecidos em quantidades variáveis sendo um cofator em inúmeras enzimas responsáveis por distintas reações metabólicas envolvendo ATP (GUERRERA et al., 2009). Sendo o segundo íon intracelular mais comum, o magnésio desempenha um papel importante no transporte de íons de cálcio e potássio através das membranas celulares via $Na^+/K^+/ATPase$, o que é de extrema relevância uma vez que esse é um processo

necessário para condução de impulsos nervosos, contração muscular, ritmo cardíaco regular, síntese de proteínas e ácido nucleicos (GRÖBER et al., 2015; BARBAGALLO et al., 2021).

Do ponto de vista clínico o magnésio é de grande interesse no tratamento de diversos distúrbios como eclampsia, asma, arritmia cardíaca, dores de cabeça e constipação por apresentar efetividade no controle dos mesmos (GUERRERA et al., 2009). Outros estudos indicaram efeitos desse íon na melhora de sintomas de doenças como Alzheimer, acidente vascular cerebral, diabetes mellitus tipo dois, doenças cardiovasculares e depressão (VOLPE, 2013; SEREFKO et al., 2016). Transtornos modernos como o estresse vem sendo associados aos níveis de Mg de forma cíclica. O estresse diminui os níveis desse íon e como consequência, a susceptibilidade ao estresse aumenta. Nesse sentido, as discussões sobre a necessidade dietética desse elemento vêm aumentando (PICKERING et al., 2020; BOYLE et al., 2017).

A pandemia que se iniciou em 2020 pelo SARS-CoV2 estimulou estudos sobre o papel do magnésio no tratamento da COVID-19 e sua ligação com respostas imunológicas a doença. A suplementação de magnésio como um adjuvante ao tratamento da COVID-19 vem demonstrando auxiliar na proteção de órgãos como fígado, coração e cérebro através de mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes e imunoregulação (TANG et al., 2020; DINICOLANTONIO & O'KEEFE, 2021). Entretanto, estudos com um número maior de pacientes por amostra com a administração de magnésio juntamente com outros componentes se torna necessário para validar sua eficácia quando administrado em pacientes confirmados para COVID-19 (TAN et al., 2020). Ainda, é demonstrado a relevância do monitoramento da homeostase do magnésio com intuito de contribuir na

prevenção de infecções por SARS-CoV2 reduzindo a evolução da doença para casos graves (TRAPANI et al., 2022).

4.1 Compostos contendo magnésio derivados do ácido valproico

Opções terapêuticas de fármacos contendo metais ainda não são difundidas e clinicamente disponíveis. Entretanto, considerando as alterações na expressão gênica envolvendo remodelamento de cromatina, RAGHUNATHAN et al. (2017) avaliaram o efeito inibitório de HDAC classe I do valproato de magnésio (MgV) na hipertrofia cardíaca, sendo esse mecanismo específico importante para o controle da doença. Além disso, PATEL et al. (2014) sugeriu o efeito benéfico do MgV sobre complicações cardiovasculares associadas a diabetes, incluindo a hipertrofia cardíaca, e auxiliando na preservação da integridade estrutural do miocárdio.

Estudos utilizando o MgV indicam que esse composto apresenta eficácia na redução da frequência de crises convulsivas quando administrado em pacientes diagnosticados para epilepsia (RAGHUNATHAN et al., 2017; PATEL et al., 2014; KHANI et al., 2021). Além disso, em relação ao valproato de sódio, o MgV apresentou maior segurança farmacológica devido a menor recorrência de efeitos adversos. (PENG et al., 2020). Entretanto, PRAJAPATI et al. (2017) em um estudo de caso relataram edema bilateral de membros inferiores, uma rara reação adversa do uso crônico de MgV no tratamento de uma paciente com bipolaridade. Ademais, uma combinação de magnésio e valproato de sódio em tratamento para enxaquecas apresentou eficácia na redução da frequência, severidade, duração das enxaquecas e diminuição na necessidade exacerbada de analgésicos ingeridos durante as crises. Sendo assim, a formulação e uso de MgV

poderá ser uma alternativa com maior segurança toxicológica e eficácia em terapias para o tratamento de enxaqueca (KHANI et al., 2021). Ainda, o MgV aplicado em doses de 20 mg e 40 mg/Kg foi capaz de inibir a atividade de desacetilases em tecidos de tumor cervical (CHAVEZ-BLANCO et al., 2005). Neste sentido, a linha de pesquisa “Novos compostos organometálicos, uma visão terapêutica de fármacos em potencial” busca-se avaliar o potencial tóxico e o efeito antiproliferativo/antitumoral de novos fármacos derivados do AV. Portanto, a molécula deste estudo consiste de complexo de magnésio [Mg(Valp)₂Phen] ou [bis(2-propil-pentanoato)(1,10-fenantrolina)magnésio(II)]. Este complexo derivado apresenta duas moléculas de AV, o ligante 1,10-fenantrolina e um átomo de magnésio em sua estrutura química. A molécula possui massa molecular 490,90 g/mol, fórmula molecular C₂₈H₃₈MgN₂O₄ e sua estrutura química é apresentada na Figura 2.

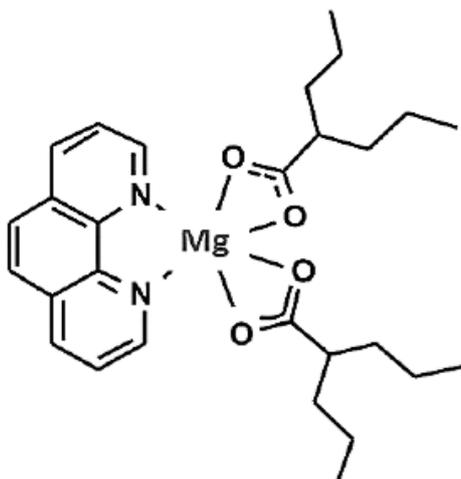


Figura 2. Estrutura química do complexo metálico [Mg(Valp)₂Phen]. (VEITIA, DUMAS, MORGANT, 2012).

5 Modelos biológicos empregados neste estudo

5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular com grande potencial como modelo biológico que vem sendo usada em diversos estudos, incluindo estudos de toxicologia. A escolha de *S. cerevisiae* como modelo biológico se dá por essa ser amplamente estudada e apresentar ciclo eucariótico típico e completo. Além disso, sendo um organismo eucarioto, apresenta rápido crescimento, simplicidade e similaridade genética com células de mamíferos tornando-a uma ferramenta biológica altamente utilizada e de grande interesse. Diferentes linhagens de leveduras são ainda utilizadas na indústria química, alimentícia e farmacêutica para diferentes fins, como produção de cervejas, bioetanol, vinhos, dentre outros (Para revisão, ver ELIODÓRIO et al., 2019; PARAPOULI et al., 2020). Além disso, *S. cerevisiae* possui empregabilidade e relevância em estudos de biologia do câncer e toxicologia (DOS SANTOS & SÁ-CORREIA, 2015; EKI, 2018). Matuo et al. (2012) discutiram as aplicações de *S. cerevisiae* na triagem de drogas visando pesquisa anticâncer, a qual é uma opção inicial rápida, barata e eficaz devido ao alto grau de similaridade entre as leveduras e reparo de DNA humano.

Além das propriedades já descritas que tornam o uso de *S. cerevisiae* de grande interesse em estudos biológicos, umas das vantagens significativa de sua utilização é seu genoma completamente sequenciado e armazenado em bases de dados. Esse conhecimento sobre as sequências de DNA permite também que esse modelo biológico seja amplamente explorado por meio de ferramentas moleculares em estudos envolvendo quimiogenômica, proteômica, transcriptoma e metaboloma (BRACONI et al., 2016). Dessa forma, por ser bem caracterizada geneticamente, a levedura se tornou a primeira

escolha de organismo teste para pesquisas de mutagênese, reparo de DNA e resposta a estresse (EKI, 2018; WYRICK & ROBERTS, 2015).

No que diz respeito a avaliação de danos ao DNA e os mecanismos de reparo envolvidos, *S. cerevisiae* é amplamente utilizada como um modelo para estudos de quebras de fita dupla e sua regulação, sendo que diversos achados sobre esse mecanismo foram inicialmente identificados nessa espécie de levedura (Para revisão, ver LI et al., 2019). Por meio da comparação da citotoxicidade com linhagens selvagens proficientes para vias de reparo, se avalia linhagens de leveduras mutantes deficientes em uma ou mais vias de reparação. Sendo assim, quando a linhagem mutante demonstra maior sensibilidade a determinado composto, sugere-se que a substância de estudo induz tipos de lesões irreversíveis para a mutante (GUINTINI et al., 2015; EKI, 2018). Rodrigues et al. (2021), utilizando linhagens de *S. cerevisiae*, apresentaram as vias de reparação envolvidas na resposta ao dano de DNA após exposição ao AV e complexos metálicos de cobre derivados do AV demonstrando a importância da empregabilidade desse modelo biológico para esses compostos.

5.1.1 Vias de reparação em *Saccharomyces cerevisiae*

O genoma se encontra exposto a agentes genotóxicos exógenos e endógenos a todo momento. Esses agentes podem ser responsáveis pelo desencadeamento de lesões no DNA, levando a disfunções celulares como a instabilidade genética, senescência e alterações permanentes como morte celular e mutagênese (CHATTERJEE & WALKER, 2017). Exposições a estresses endógenos e exógenos, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO), radiações ionizantes (RI) e radiação ultravioleta (UV), assim como agentes rádio e quimioterápicos, podem causar danos ao DNA levando a mutações, adutos

de base, erros de emparelhamento (*Mismatch*), formação de alquil guanina O6, quebras de cadeia dupla (*Double Strand Breaks – DSBs*), quebras de cadeia simples (*Single Strand Breaks – SSBs*), inserções, deleções e rearranjos cromossômicos. Esses eventos ocorrem após a divisão celular ou durante a replicação do DNA (CHATTERJEE & WALKER, 2017). Como consequência dessas disfunções, mecanismos de reparação do DNA são recrutados para proteger a integridade do material genético (Figura 3) (HOEIJMAKERS, 2001).

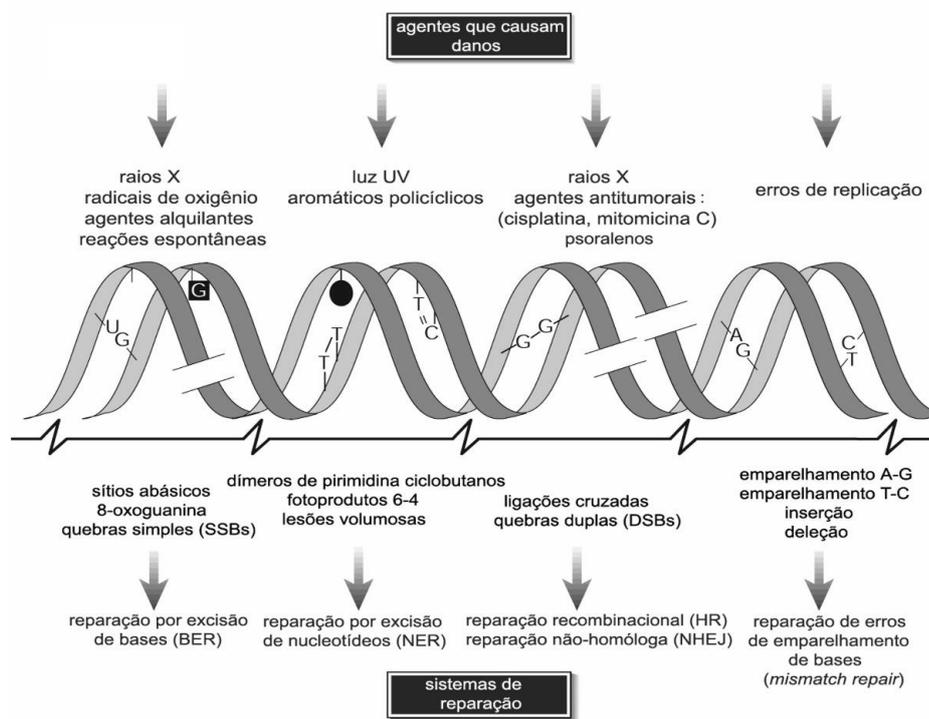


Figura 3. Agentes nocivos ao DNA que causam danos ao DNA e mecanismos de reparação responsáveis pela remoção das lesões (HOEIJMAKERS, 2001).

Assim, os danos no DNA são reparados pelos mecanismos de Reparação por Excisão de Bases (*Base Excision Repair – BER*), Reparação por Excisão de Nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair – NER*), Reparação Homóloga (*Homologous Repair – HR*),

Reparação não-Homóloga (*Non-homologous End-Joining* – NHEJ) e Reparações Pós Replicativas (*Post Replications Repair* – PRR) (Figura 3). BER atua na remoção de modificações químicas no DNA ou nucleotídeos simples que foram alterados por oxidação, alquilação, desaminação ou metilação (CHATTERJEE & WALKER, 2017; HOEIJMAKERS, 2001). NER é requerido, sobretudo, quando ocorre o bloqueio da transcrição, principalmente em lesões que causam distorções na dupla hélice do DNA, tais como dímeros de pirimidina e pontes intercadeias e intracadeias (SPIVAK, 2015). Os mecanismos de reparação homóloga e não-homóloga removem os danos mais tóxicos e difíceis de reparar no DNA, as DSBs. A HR predomina na fase S do ciclo celular e requer uma sequência de DNA homóloga para uma reparação livre de erros, e a NHEJ predomina na fase G1 do ciclo celular e não requer uma sequência homóloga para a reparação, sendo propensa a erros (XU & XU, 2020; LIEBER, 2010). No entanto, qualquer distorção na estrutura do DNA pode dificultar o processo e fazer com que a forquilha de replicação pare. Se parada por muito tempo, a forquilha pode entrar em colapso, levando a quebras duplas no DNA e gerando uma instabilidade genômica (ARBEL et al., 2020). Entretanto, é extremamente importante retomar a replicação mesmo diante de danos persistentes no DNA. Assim, lesões capazes de bloquear a replicação, geralmente consideradas letais para a célula, podem não se reparadas pelas vias BER e NER ativando as vias de tolerância a dano (BRANZEI & PSAKHYE, 2016). O reparo pós replicativo (*Post Replication Repair* – PRR) utiliza dois mecanismos principais que permitem a replicação que foi paralisada continue. A primeira é o escape (*by-pass*) indireto usando o mecanismo de prevenção de danos, o segundo é a via de reparação chamada de síntese de translesão. Quando a síntese de translesão (*Translesion Synthesis* – TLS) é acionada, DNAs

polimerases com menor especificidade que atuam nesta via inserem um nucleotídeo (correto ou não) no lado oposto à base lesada, ultrapassando a lesão, reiniciando a replicação (YANG & GAO, 2018).

Diversas proteínas estão envolvidas nos mecanismos de reparação utilizados pelas células em resposta a diferentes agentes causadores de danos. Na Tabela 1 são apresentadas as proteínas correspondentes das vias de reparação analisadas no presente trabalho e suas respectivas funções.

Tabela 1: Principais proteínas do sistema BER, NER, HR, NHEJ, PRR e TLS em *S. cerevisiae*.

Via	Proteína	Função	Referência
BER	Apn1	A principal AP endonuclease envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes oxidativos e alquilantes. Também possui funções como uma exonuclease 3'-5' para reparar danos do tipo 8-oxoguanina; geneticamente, interage com Ntg1 para manter a integridade do genoma mitocondrial.	(ISHCHENKO et al., 2005) (PHADNIS et al., 2006)
	Apn2	AP endonuclease, envolvida na reparação por excisão de bases no DNA.	(UNK et al., 2000)
	Rad27	'Flap' endonuclease com atividade 5' – 3' exonuclease. Rad27 codifica uma nuclease multifuncional envolvida no processamento de fragmentos de Okazaki durante a replicação do DNA, reparação de excisão de base (BER) e manutenção da estabilidade do genoma. A sua atividade de endonuclease de extremidade 5' é necessária para clivar a aba 5' de fragmentos de Okazaki, que é gerada durante a síntese da cadeia, e para remover a extremidade de 5'-desoxirribosefosfato, que é formada em sítios AP durante BER. A exonuclease 5' - 3' de Rad27p está envolvida na prevenção da expansão das repetições di e trinucleotídicas por remoção de estruturas secundárias que são formadas pelas sequências repetidas.	(SOMMER et al., 2008) (SPARKS et al., 2012) (DASTIDAR et al., 2012)
	Ogg1	DNA glicosilase e AP liase que excisa danos do tipo 8-oxoguanina. Contribui para a resistência a UVA.	(SINGH et al., 2001) (KOZMIN et al., 2005)
	Mag1	DNA glicosilase 3-metil-adenina. Envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes alquilantes. Inicia o reparo de excisão de base removendo bases danificadas para criar sítios abásicos que são posteriormente reparados.	(TKACH et al., 2012)

	Ntg1	DNA glicosilase e AP liase. Atua no núcleo e na mitocôndria. Envolvida na reparação de danos ao DNA por agentes oxidativos.	(PHADNIS et al., 2006) (GRIFFITHS et al., 2009)
	Ntg2	DNA glicosilase e AP liase que atua no núcleo. Paráloga de Ntg1.	(MEADOWS; SONG; DOETSCH, 2003) (GRIFFITHS et al., 2009)
NER	Rad1	Endonuclease de cadeia simples que cliva a extremidade 5' do oligonucleotídeo que contém a lesão, junto com Rad10.	(PRAKASH; PRAKASH, 2000) (SYMINGTON, 2002)
	Rad4	Proteína que reconhece e se liga ao dano no DNA juntamente com Rad23, atuando na dobra de proteínas ubiquitinadas. Rad4 e Rad23 formam um complexo estequiométrico chamado NEF2, que é requerido em NER. NEF2 (<i>NER factor 2</i>) se liga especificamente a danos UV no DNA. Mutantes rad4 são extremamente sensíveis a UV e completamente deficientes em NER.	(LI et al., 2010) (ZHOU et al., 2015)
	Rad10	Endonuclease de cadeia simples que cliva a extremidade 5' do oligonucleotídeo, junto com Rad1.	(PRAKASH; PRAKASH, 2000) (SYMINGTON, 2002)
	Rad14	Proteína que reconhece e se liga ao dano. Subunidade de NEF1 que contém motivo de dedo de zinco.	(PRAKASH; PRAKASH, 2000)
HR	Rad52	Proteína que estimula o anelamento e a troca de cadeias entre as fitas, facilitando a ligação de Rad51p no DNA. Envolvida na reparação de quebras duplas no DNA e ligação homóloga final.	(SYMINGTON, 2002) (SHINOHARA; OGAWA, 1998)
NHEJ	Rad50	Endo e exonuclease, subunidade do complexo MRX com Mre11p e Xrs2p, que se liga ao DNA. Envolvida na reparação de quebras duplas e ligação homóloga ou não homóloga final.	(SYMINGTON, 2002) (TKACH et al., 2012)
PRR	Rad6	Enzima conjugadora de ubiquitina (E2), envolvida na reparação pós-replicativa juntamente com Rad18, regula a poliubiquitinação de K63 em resposta ao estresse oxidativo.	(STOLZ et al., 2013) (SILVA; FINLEY; VOGEL, 2015)
	Rad18	Enzima ubiquitina ligase (E3), envolvida na reparação pós replicativa juntamente com Rad6. Liga-se ao DNA e tem atividade de ATPase. Envolvida na SUMOrilação do PCNA.	(PARKER; ULRICH, 2012)
TLS	Rev1	Enzima desoxicidil transferase, envolvida na reparação de sítios abásicos e adutos de guanina na TLS. Forma complexos com a DNA polimerase zeta, Rev3p e Rev7p. <i>REVI</i> codifica uma desoxicidil transferase, uma DNA polimerase que preferencialmente incorpora um C através de sítios abásicos ou bases danificadas.	(HARACSKA et al., 2001) (TKACH et al., 2012)
	Rev3	Subunidade catalítica da DNA pol zeta (ζ). Ultrapassa lesões do tipo dímeros de pirimidina e sítios AP. Repara DSB's.	(MAKAROVA; STODOLA; BURGERS, 2012) (LEE; MYUNG, 2008)

Rad30	Rad30p codifica a DNA polimerase eta, incorpora nucleotídeos em uma ampla gama de lesões no DNA, tais como dímeros, pares de bases danificadas e sítios abásicos que podem fazer com que a forquilha de replicação se paralise. Rad30p é comumente considerada uma polimerase da TLS livre de erros. Rad30p é recrutada na forquilha de replicação após a ubiquitinação de PCNA pelo complexo Rad6p-Rad18p em resposta ao dano do DNA	(JOHNSON; PRAKASH; PRAKASH, 1999); (YUAN et al., 2000); (CHATTERJEE; PABLA; SIEDE, 2013).
-------	---	---

5.2 Fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79)

A linhagem celular V79 é proveniente de *Cricetulus griseus*, uma espécie de hamster conhecida popularmente como hamster chinês. Morfologicamente é caracterizada como fibroblastos originários do pulmão, apresentando taxa de crescimento rápido e cariótipo caracterizados e estáveis. Devido ao seu emprego em diferentes áreas da toxicologia, as células V79 são consideradas um modelo biológico uma vez que essa foi uma das linhagens celulares de mamíferos pioneiras em estudos de mutagênese. Sendo assim, as células V79 são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (BRADLEY et al., 1981; KRAHN, 1983).

A empregabilidade de células V79 em estudos de genotoxicidade e citotoxicidade é muito ampla e é explorada até os dias atuais. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) determina V79 como uma linhagem padrão a ser seguida para diferentes testes em diretrizes publicadas. Os principais testes onde a utilização dessa linhagem é indicada são testes *in vitro* de micronúcleo e aberrações cromossômicas descritos em diretrizes para testes de produtos químicos (OECD, 2014; OECD, 2016). Além disso, a OMS (2020) em uma revisão para a identificação e caracterização de perigos sugere células V79 para testes de genotoxicidade e mutagenicidade.

Embora essa linhagem celular de mamífero seja amplamente utilizada em testes de citotoxicidade e genotoxicidade, algumas características genéticas dessas células devem ser levadas em consideração quanto a sua resposta em testes toxicológicos. As células V79 são deficientes em p53, uma proteína de extrema importância na resposta celular ao dano o DNA impedindo a progressão do ciclo celular ou induzindo morte celular (CHAUNG et al., 1997; LEVINE, 2020). Dessa forma, são necessários critérios cautelosos em estudos que empregam essa linhagem, evitando falsos positivos, o que reforça a indispensabilidade do uso de linhagens celulares derivadas de humanos na área toxicológica (FOWLER et al., 2012).

5.3 Linhagens celulares de glioblastoma multiforme utilizadas neste estudo

A utilização de linhagens comerciais de câncer humano *in vitro* é amplamente disseminada como modelos no estudo da atividade antiproliferativa de moléculas e seus mecanismos de ação. Esses modelos têm a vantagem da disponibilidade comercial, fácil cultivo e ampla aplicabilidade em diferentes ensaios. Linhagens celulares de glioblastoma multiforme possuem diferentes morfologias como fibroblástica e epitelial de acordo com seu tipo celular. Além disso, devido a origem individual de cada linhagem, essas possuem deficiência para diferentes proteínas e cariótipos únicos bem caracterizados (Tabela 1).

A linhagem M059J é deficiente na atividade da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKs), importante para o reparo de quebra de fita de DNA e são deficientes na reparação de quebras duplas no DNA (GOODWIN & KNUDSEN, 2014). Diferentemente, a linhagem U87MG e U251MG possuem deficiência na proteína fosfatase homóloga à tensina (PTEN), uma proteína presente no núcleo e envolvida na

supressão de tumores (ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2019). Entretanto, a linhagem U251MG é ainda deficiente na proteína p53 (WILLIAMS & SCHUMACHER, 2016).

Tabela 2. Caracterização das diferentes linhagens celulares de glioblastoma multiformes empregadas nesse estudo.

Linhagem	M059J	U87MG	U251MG
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tecido	Cérebro	Cérebro	Cérebro
Tipo Celular	Glia	Astrócito	Astrócito
Morfologia	Fibroblasto	Epitelial	Epitelial
Doença	Glioblastoma	Glioblastoma	Glioblastoma
Deficiência	DNA-PKs	PTEN	PTEN e p53

Fonte: *American Type Culture Collection (ATCC)*

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar a toxicidade genética, potencial antiproliferativo e mecanismos relacionados do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado de ácido valproico com 1,10 fenantrolina em diferentes modelos biológicos.

Objetivos específicos

- Verificar a citotoxicidade em células V79 expostas ao AV e $[\text{Mg}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$;
- Determinar a genotoxicidade e o potencial mutagênico do AV e do complexo em células V79;
- Determinar a citotoxicidade, mutagenicidade e as vias de reparo de DNA envolvidas na reparação de danos em diferentes linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar, por dicroísmo circular, a capacidade de interação dos derivados de AV com o DNA e as alterações estruturais induzidas.
- Comparar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do AV e do complexo em glioblastomas humanos (linhagens M059J, U87MG e U251MG) em comparação com linhagem humana não tumoral (MRC5);

CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO I

Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina em *Saccharomyces cerevisiae* e em células de mamíferos V79

O capítulo I apresenta os dados obtidos no formato de artigo intitulado “Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina em *Saccharomyces cerevisiae* e em células de mamíferos V79”, o qual será submetido a revista *Mutation Research*.

Nesse capítulo são descritos e discutidos resultados toxicológicos envolvendo um novo complexo metálico [Mg(Valp)₂Phen]. Os dados demonstram o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do complexo de magnésio em células V79 em comparação ao valproato de sódio. Comparando-se a sensibilidade de linhagens de *S. cerevisiae* deficientes e proficientes em reparo de DNA foram determinadas as vias de reparação envolvidas no reparo das lesões no DNA induzidas por este complexo metálico.

CAPÍTULO II

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO II

Potencial citotóxico e genotóxico do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina em células de glioblastoma multiforme.

O capítulo II apresenta os resultados obtidos em formato de artigo científico, o qual será submetido a revista *Mutation Research*, intitulado “Atividade antitumoral do complexo ternário mononuclear de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina em células de glioblastoma multiforme”.

No presente capítulo são descritos e discutidos dados em relação a atividade antitumoral e mecanismos relacionados de um novo complexo de magnésio derivado do ácido valproico com 1,10-fenantrolina. Os resultados demonstram o potencial citotóxico e genotóxico *in vitro* do complexo de magnésio superior ao valproato de sódio em células de glioblastoma multiforme, com seletividade interessante em relação à linhagem não tumoral. Esses fatos, sugerem que esse derivado possa ser um bom candidato no estudo de agentes citotóxicos com potencial aplicação em terapias antitumorais.

DISCUSSÃO

O AV é um medicamento utilizado de forma ampla e tradicional no tratamento de doenças que atingem o SNC como bipolaridade, esquizofrenia e convulsões (ZHU et al., 2017; ROMOLI et al., 2019). A descoberta de seu potencial epigenético como inibidor de proteínas HDAC gerou interesse para o uso desse medicamento em tratamentos anticâncer uma vez que o AV poderia atuar em processos celulares importantes como transcrição e expressão gênica influenciando no ciclo celular, apoptose e morte celular (DE SOUZA & CHATTERJI, 2015). Entretanto, o AV apresenta limitações para seu uso devido a toxicidade observada (ABDELKADER et al., 2020). Sendo assim, se torna necessário modificações na molécula desse fármaco de modo a obter maior efeito farmacológico com redução de reações adversas, com consequente melhora terapêutica (CHOI et al., 2018). Desta forma, a síntese de compostos derivados do AV vem se tornando uma alternativa interessante. Nesse sentido, o derivado metálico de AV [Cu(Valp)₂Phen] apresentou maior efeito anticonvulsivante 3000 vezes maior em relação ao VA quando testado em ratos e sem aumento na toxicidade (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009). Além disso, os derivados [Cu₂(Valp)₄], [Cu(Valp)₂Phen] e [Cu(Valp)₂Bipy] apresentaram maior citotoxicidade em células V79 e capacidade de clivagem e interação com o DNA in vitro, o que indica o potencial uso de moléculas contendo íons metálicos como futuros agentes citotóxicos (PICH et al., 2019). Derivados do AV contendo íons de magnésio também vem sendo sintetizados. O valproato de magnésio (MgV), quando testado em pacientes diagnosticados para epilepsia, apresentou maior efetividade e efeitos colaterais reduzidos quando comparado a sua molécula protótipo no controle de convulsões (PENG et al., 2020). A atividade antitumoral desse

composto, o MgV aplicado em doses de 20 mg e 40 mg/Kg foi capaz de inibir a atividade de desacetilases em tecidos de tumor cervical (CHAVEZ-BLANCO et al., 2005). Dessa forma, é necessário o entendimento da toxicidade de novos fármacos elegíveis para tratamentos anticâncer ou outros efeitos terapêuticos. Sendo assim, o presente trabalho avaliou o potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e as vias de reparação de DNA envolvidas no reparo de lesões induzidas pelo complexo derivado do AV [Mg(Valp)₂Phen] em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79) e *S. cerevisiae*. Além disso, buscando ampliar os testes quanto a atividade antitumoral, avaliamos o potencial citotóxico e genotóxico do complexo [Mg(Valp)₂Phen] em linhagens de glioblastoma multiforme (M059J, U87MG e U251MG) em comparação à células não tumorais (MRC5).

Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT mostraram que o complexo de magnésio possui efeitos citotóxicos dose-dependentes em cerca de ~4000 a ~9000 vezes maior nas células V79 e ~160 vezes maior em leveduras em relação ao AV (Capítulo I, Fig. 2 e 5). Além disso, o perfil de citotoxicidade aumentada se repete em células de glioblastoma que se mostraram mais sensíveis ao complexo de magnésio do que ao valproato de sódio (Capítulo II, Fig. 2). Pode-se observar ainda que o complexo de magnésio apresenta maior seletividade quando testado em células tumorais considerando o índice de seletividade calculado onde os valores de SI foram > 1 para o complexo de magnésio enquanto para o valproato de sódio foram 1 < (Capítulo II, Tabela 2). De forma coerente, os resultados obtidos no ensaio de sobrevivência clonogênica apresentaram o mesmo perfil de toxicidade observado no ensaio de MTT para células V79 e para as linhagens tumorais (Capítulo I e II, Fig. 3). Coerentemente, complexos metálicos de cobre

e à base de AV contendo ligantes de fenantrolina e biperidina apresentam aumento da citotoxicidade em relação ao valproato de sódio devido à sua capacidade de interagir com o DNA e promover a clivagem do DNA (PICH et al., 2019). Sendo assim, a inclusão de metais e ligantes biologicamente ativos é capaz de aumentar a toxicidade dos complexos derivados do AV.

O valproato de sódio não possui capacidade de interação com o DNA (PICH et al., 2019) e sua toxicidade está ligada a propriedades moduladoras epigenéticas atuando como inibidor de HDAC. Além disso, o valproato de sódio também é capaz de induzir estresse oxidativo pelo aumento da produção de EROs e redução das defesas antioxidantes levando a danos ao DNA (TSENG et al., 2017) Nesse sentido, dados previamente publicados pelo nosso grupo utilizando ensaios de sobrevivência em levedura, mostraram que o valproato de sódio é capaz de induzir danos oxidativos ao DNA considerando a sensibilidade aumentada da linhagem deficiente para Ogg1p (glicosilase com atividade liase associada a excisão de 8-oxoG e formamidoprimidinas oxidadas) (RODRIGUES et al., 2020). Ainda, a geração de EROs pelo valproato de sódio pode induzir lesões ao DNA como bases oxidadas que bloqueiam a replicação do DNA levando mutações ou morte celular. Em casos de reparo, essas lesões são processadas pelas vias BER e TLS que podem atuar efetivamente ou originar células com mutações (Capítulo I, Tabela 3) (RODRIGUES et al., 2020). Assim, o aumento de danos ao DNA observado em V79 e gliomas pelo ensaio cometa (Capítulo I e II, Fig. 4) e teste de micronúcleo (Capítulo I, Tabela 2) (capítulo II, Tabela 3) após exposição ao valproato de sódio pode ser resultado do ataque de EROs ao DNA (COOKE et al., 2003). Em relação as linhagens tumorais, o valproato de sódio apresentou menor seletividade que o

complexo de magnésio (Capítulo II, tabela 2). A menor sensibilidade dos gliomas em relação a linhagem não tumoral pode estar diretamente ligada com a relação entre as características genética das linhagens e o mecanismo de ação da molécula. A toxicidade dependente de p53 do valproato de sódio em linhagens tumorais explicaria a menor sensibilidade da linhagem U251MG em relação a linhagem não tumoral considerando que esse glioblastoma não possui p53 funcional (CHEN et al., 2009). Além disso, o AV teria capacidade de atuar sobre a via de sinalização PI3K/Akt que esta envolvida na inibição de estímulos apoptóticos. Atuando como um antagonista a esta via de sinalização, PTEN age como um inibidor molecular desta via e induz a apoptose celular (ZHANG et al., 2016). Nesse sentido, a deficiência de PTEN característica das linhagens celulares U87MG e U251MG pode ajudar a explicar a menor sensibilidade ao valproato de sódio. Por fim, um dos mecanismos de toxicidade do AV, previamente discutido, é a geração de estresse oxidativo e alteração do equilíbrio redox da célula. Entretanto, células de glioblastoma podem desenvolver adaptação metabólica ao estresse oxidativo aumentando as defesas antioxidantes. Esse mecanismo de resistência poderia explicar de modo geral a sensibilidade reduzida das linhagens de glioblastoma observada em relação a linhagem não tumoral (OLIVIER et al., 2020).

Em contraste ao valproato de sódio, o complexo de magnésio parece não possuir sua toxicidade ligada a estresse oxidativo considerando que a linhagem de levedura deficiente para Ogg1p não mostrou sensibilidade ao complexo (Capítulo I, Fig. 6A). Além disso, os mutantes para as proteínas envolvidas na via reparo BER (*ogg1Δ*, *mag1Δ*, *apn1Δ*, *apn2Δ*, *ntg1Δ* or *ntg2Δ*) demonstraram resistência ao complexo de magnésio sugerindo que as proteínas de BER possivelmente participam da citotoxicidade do

composto (Capítulo I, Figura 6A e E). Entretanto, linhagens deficientes em NER (*rad1Δ*, *rad10Δ*, *rad4Δ* or *rad14Δ*) (Capítulo I, Figura 6B) e BER/NER (*ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ*) apresentaram sensibilidade ao complexo de magnésio. A via de reparo NER atua sobre lesões de DNA maiores que distorcem a dupla hélice e bloqueiam processo celulares como replicação e transcrição (LE MAY et al., 2010). Em concordância a este fato, foi observado pelo teste de dicroísmo circular, o [Mg(Valp)₂Phen] se mostrou capaz de causar distorções na dupla hélice sugerindo efeito intercalante (Capítulo I, Figura 7). Como resultado da habilidade de intercalação, o complexo de magnésio é capaz de induzir aumento no número de mutações no locus de *hom3-10* indicando a indução de mutação que causa alteração no quadro de leitura (Capítulo I, Tabela 3). A intercalação do complexo com o DNA pode induzir lesões que levam ao acúmulo de proteínas, possivelmente proteínas da via de reparo BER, que provocam bloqueio no processo de replicação. Esse bloqueio leva a ativação da via PRR mediada por Rad6p e Rad18p gerando a troca da DNA polimerase replicativa para a DNA polimerase envolvida no reparo por TLS (ARBEL et al., 2020). Nesse sentido, linhagens *rad6Δ*, *rad18Δ* e *rad30Δ* mostraram sensibilidade ao complexo de magnésio (Capítulo I, Figura 6D). Entretanto, linhagens deficientes para Rev1p e Rev3p apresentaram resistência ao complexo de magnésio que pode estar ligada ao fato da polimerase Rad30p atuar de forma mais eficaz no reparo de lesões induzidas pelo complexo. Entretanto, quando as lesões induzidas pelo complexo de magnésio não podem ser reparadas pode ocorrer a parada da forquilha de replicação e quebras no DNA como demonstrado pelo teste cometa (Capítulo I e II, Fig. 4). Sendo assim, outras vias alternativas, como HR e NHEJ, podem ser recrutadas. De fato, mutantes *rad52Δ* e *rad50Δ* demonstraram maior sensibilidade quando expostas ao

complexo de magnésio (Figura 6C – Cap. I). Se ainda assim as lesões não puderem ser reparadas, ocorre a formação de quebras cromossômicas e rearranjos levando a formação de micronúcleos (FENECH et al., 2011). De fato, foi observado um aumento significativo no número de células micronucleadas em linhagens V79 (Capítulo I, Tabela 2) e gliomas (M059J, U87MG e U251MG) (Capítulo II, Tabela 3). Interessantemente, o complexo de magnésio apresentou maior seletividade que o valproato de sódio considerando os valores de SI observados, onde para o complexo de magnésio os índices se mostraram > 1 enquanto para o valproato de sódio os índices foram $1 <$ (Capítulo II, Tabela 2). Além disso, a linhagem M059J se mostrou mais sensível com complexo em relação as linhagens U87MG e U251MG. Esse fato pode estar ligado a ausência de DNA-PK, proteína envolvida na via NHEJ, e deficiência no reparo de quebras de fitas duplas (GOODWIN & KNUDSEN, 2014; HOPPE et al., 2000). Além disso, U87MG é uma linhagem celular deficiente em PTEN que atua como supressor de tumor e modula a expressão de RAD51 a qual participa da via de reparo HR (ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2019; SHARMA & ALMASAN, 2021). Coerentemente, células deficientes em PTEN, como U87MG e U251MG apresentam hipersensibilidade a danos no DNA ocasionados por radiação ionizante (BASSI et al., 2013). As vias HR e NHEJ se mostraram alternativas no reparo de lesões induzidas pelo complexo de magnésio em levedura e a deficiência de proteínas ligadas a essas vias pode gerar maior sensibilidade ao composto. Adicionalmente, U251MG é deficiente em p53, que apesar de possuir importante papel como supressor de tumor, não pareceu contribuir para o aumento da citotoxicidade no complexo considerando o padrão de sensibilidade similar entre U251MG e U87MG (BOUTELLE et al., 2021).

Em resumo, o nosso modelo (Fig. 3A) propõe que o valproato de sódio seja capaz de induzir estresse oxidativo pela formação de EROs, levando a danos no DNA que podem ser reparados pelas vias BER e TLS. Sendo que a via TLS pode levar a formação de mutações pontuais (*error-prone*) ou a fidelidade na sequência do DNA (*error-free*). Em casos de não reparação das lesões no DNA induzidas pelo valproato de sódio, podem ocorrer quebras no DNA, mutações pontuais e consequente morte celular (Fig. 3 A). Além do estresse oxidativo, um dos mecanismos de toxicidade do valproato de sódio se dá pela inibição de HDAC que pode levar a hiperacetilação de genes e alterar sua expressão. Esse processo pode aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas como PTEN e p53 ou inibir DNA-PK (envolvida na reparação de DNA). Neste racional, as linhagens glioblastoma multiforme utilizadas nesse estudo são mutantes nos genes que codificam PTEN (U87MG e U251MG), p53(U251MG) e DNA-PK (M059J). Esse fato pode justificar as células de gliomas terem apresentado menor sensibilidade ao valproato de sódio em relação a linhagem não tumoral (MRC5). Diferentemente, para o complexo nosso modelo (Fig. 3B) propõe que a molécula é capaz de se intercalar no DNA o que pode induzir alterações na sua estrutura. Essas alterações podem recrutar a via NER e se não reparadas podem levar a mutações como frameshift e bloqueio de replicação, nesse caso induzindo a participação das vias TLS e PRR. Ainda, o bloqueio de replicação pode induzir a formação de quebras no DNA que são substratos para intervenção de HR e NHEJ. Portanto, se não reparadas, as lesões induzidas pelo complexo a quebras no DNA, mutações e consequentemente morte celular. Ainda, a via de reparo BER parece contribuir na toxicidade do complexo. Essa diferença no mecanismo de toxicidade em relação ao valproato de sódio pela alteração na molécula. Essa alteração justifica o fato

do complexo $[Mg(Valp)_2Phen]$ apresentar maior potencial citotóxico e genotóxico que o valproato de sódio em levedura, células V79, MRC5 e gliomas. Por fim, o complexo $[Mg(Valp)_2Phen]$ mostrou maior seletividade que o valproato de sódio apresentando maior citotoxicidade em células tumorais de glioblastoma do que em células não tumorais, possivelmente devido a deficiência das células tumorais em DNA-PK e PTEN. Desta forma, os efeitos biológicos encontrados para este complexo podem ser explorados para um possível futuro emprego em terapias antiproliferativas.

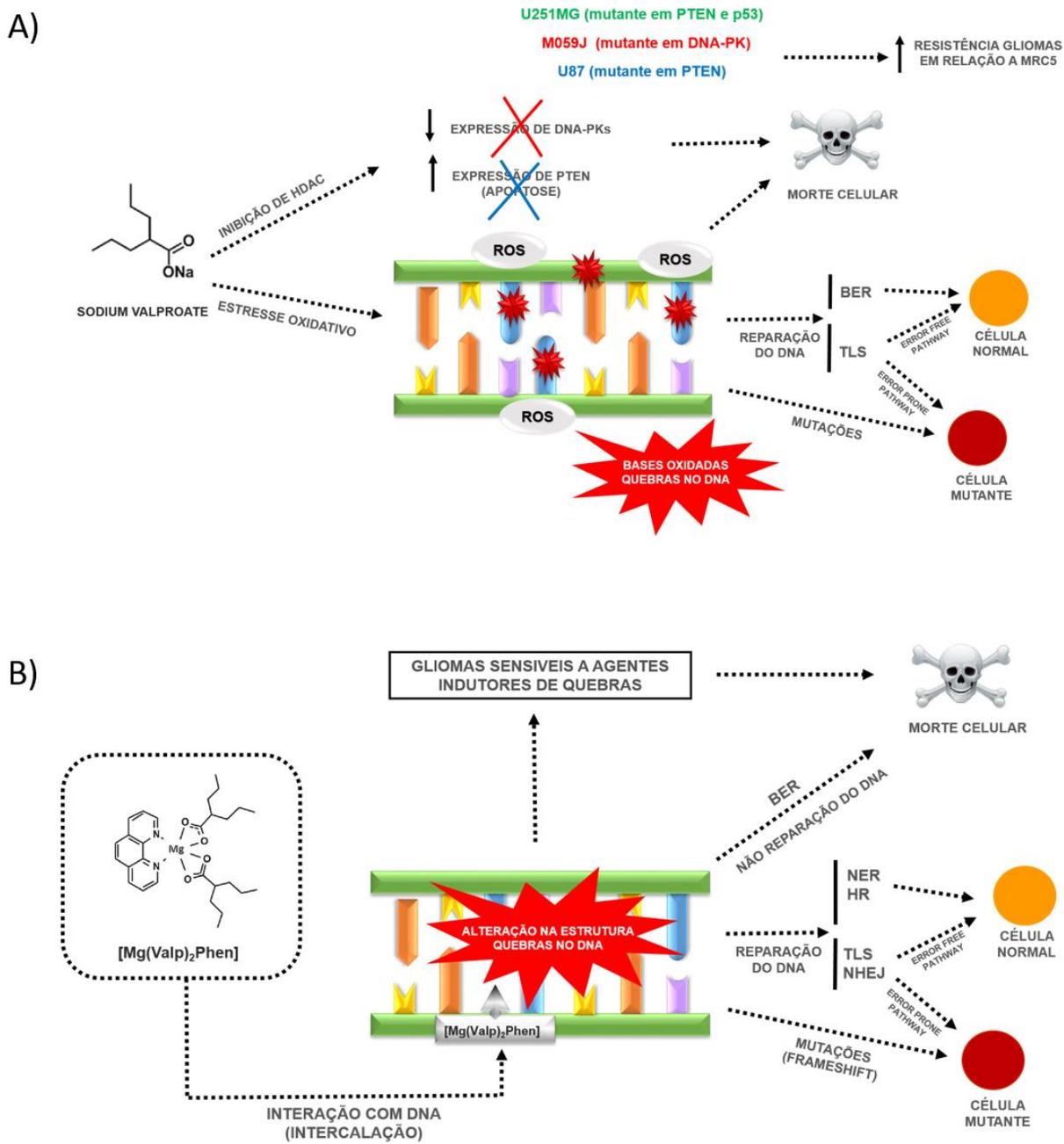


Figura 4. Mecanismos de toxicidade do valproato de sódio (A) e [Mg(Valp)₂Phen] (B).

CONCLUSÕES

Conclusão geral

O presente estudo mostrou que o complexo de magnésio [Mg(Valp)₂Phen] tem a capacidade de interagir e possivelmente intercalar no DNA, diferente do AV em que a toxicidade tem grande participação da indução de danos oxidativos. Consequentemente induzem lesões no DNA de naturezas distintas, recrutando, assim, vias de reparação específicas para cada molécula. Desta forma, resultam em uma intensidade de citotoxicidade e genotoxicidade diferentes entre as moléculas, sendo o complexo mais tóxico do que o AV em todos os modelos avaliados. Esse efeito do complexo foi mais pronunciado em glioblastomas e com maior seletividade

Conclusões específicas

- O complexo [Mg(Valp)₂Phen] possui maior potencial citotóxico e genotóxico em células V79 e levedura do que o valproato de sódio.
- As lesões induzidas ao DNA pelo complexo [Mg(Valp)₂Phen] são processadas pelas vias NER, TLS, HR, NHEJ e PRR.
- O complexo [Mg(Valp)₂Phen] apresentou potencial citotóxico e genotóxico em linhagens celulares de glioblastoma multiforme.
- O padrão de toxicidade observado em células de glioblastoma e na linhagem celular não tumoral sugere possível seletividade do complexo de magnésio.
- A toxicidade do complexo de magnésio é possivelmente ligada a habilidade de intercalação com o DNA podendo gerar alterações na estrutura da dupla hélice.

PERSPECTIVAS

De forma a ampliar o conhecimento em relação aos mecanismo envolvidos na toxicidade do complexo [Mg(Valp)₂Phen] e do AV, sobretudo em glioblastomas, seria relevante que ensaios mais aprofundados fossem desenvolvidos.

- Investigar pelo método TARDIS um possível efeito inibidor de TopoI e TopoII exercido pelo complexo [Mg(Valp)₂Phen] em células tumorais.
- Analisar possíveis sítios de ligação topoisomerases-complexo por docking molecular.
- Determinar os efeitos do [Mg(Valp)₂Phen] sobre o perfil do ciclo celular de gliomas e células não tumorais.
- Avaliar a ocorrência diferencial de apoptose em gliomas e células não tumorais expostas ao [Mg(Valp)₂Phen].
- Determinar o potencial inibidor de HDAC do complexo [Mg(Valp)₂Phen].
- Verificação da indução de quebras duplas pelo complexo [Mg(Valp)₂Phen] através de ensaios com gama H2AX.
- Testar o complexo [Mg(Valp)₂Phen] em terapias combinadas com outras moléculas e tempos distintos de exposição em células de glioblastoma multiforme *in vitro*.
- Avaliar o padrão de toxicidade do complexo [Mg(Valp)₂Phen] para exposição crônica em gliomas e células não tumorais.
- Avaliar o efeito antiproliferativo do complexo em outros tipos de linhagens de câncer.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, N. F.; ELYAMANY, M.; GAD, A. M.; ASSAF, N. *et al.* Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. **J Pharmacol Sci**, 143, n. 1, p. 23-29, May 2020.
- ALAMA, A.; TASSO, B.; NOVELLI, F.; SPARATORE, F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. **Drug Discov Today**, 14, n. 9-10, p. 500-508, May 2009.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacol Ther**, 152, p. 63-82, Aug 2015.
- ÁLVAREZ-GARCIA, V.; TAWIL, Y.; WISE, H. M.; LESLIE, N. R. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. **Semin Cancer Biol**, 59, p. 66-79, 12 2019.
- ARBEL, M.; LIEFSHITZ, B.; KUPIEC, M. How yeast cells deal with stalled replication forks. **Curr Genet**, 66, n. 5, p. 911-915, Oct 2020.
- ATMACA, A.; AL-BATRAN, S. E.; MAURER, A.; NEUMANN, A. *et al.* Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. **Br J Cancer**, 97, n. 2, p. 177-182, Jul 16 2007.
- BASSI, C.; HO, J.; SRIKUMAR, T.; DOWLING, R. J. *et al.* Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. **Science**, 341, n. 6144, p. 395-399, Jul 26 2013.

- BATASH, R.; ASNA, N.; SCHAFFER, P.; FRANCIS, N. *et al.* Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. **Curr Med Chem**, 24, n. 27, p. 3002-3009, 2017.
- BEI, R.; MARZOCHELLA, L.; TURRIZIANI, M. The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, 5, n. 3, p. 172-187, Nov 2010.
- BERENDSEN, S.; FRIJLINK, E.; KROONEN, J.; SPLIET, W. G. M. *et al.* Effects of valproic acid on histone deacetylase inhibition in vitro and in glioblastoma patient samples. **Neurooncol Adv**, 1, n. 1, p. vdz025, 2019 May-Dec 2019.
- BIALER, M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? **Epilepsia**, 53 Suppl 7, p. 26-33, Dec 2012.
- BIALER, M.; YAGEN, B. Valproic Acid: second generation. **Neurotherapeutics**, 4, n. 1, p. 130-137, Jan 2007.
- BOUTELLE, A. M.; ATTARDI, L. D. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. **Trends Cell Biol**, 31, n. 4, p. 298-310, 04 2021.
- BOYLE, N. B.; LAWTON, C.; DYE, L. The Effects of Magnesium Supplementation on Subjective Anxiety and Stress-A Systematic Review. **Nutrients**, 9, n. 5, Apr 26 2017.
- BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. **J Proteomics**, 137, p. 19-34, Mar 30 2016.
- BRADLEY, M. O.; BHUYAN, B.; FRANCIS, M. C.; LANGENBACH, R. *et al.* Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and

- analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. **Mutat Res**, 87, n. 2, p. 81-142, Sep 1981.
- BRANZEI, D.; PSAKHYE, I. DNA damage tolerance. **Curr Opin Cell Biol**, 40, p. 137-144, 06 2016.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018.
- CHATEAUVIEUX, S.; MORCEAU, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. **J Biomed Biotechnol**, 2010, 2010.
- CHATEAUVIEUX, S.; MORCEAU, F.; DIEDERICH, M. Valproic Acid. *In*: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. Third Edition ed. Academic Press, 2014. p. 905-908.
- CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environ Mol Mutagen**, 58, n. 5, p. 235-263, 06 2017.
- CHAUNG, W.; MI, L. J.; BOORSTEIN, R. J. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. **Nucleic Acids Res**, 25, n. 5, p. 992-994, Mar 01 1997.
- CHAVEZ-BLANCO, A.; SEGURA-PACHECO, B.; PEREZ-CARDENAS, E.; TAJA-CHAYEB, L. *et al.* Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. **Mol Cancer**, 4, n. 1, p. 22, Jul 07 2005.

- CHELLURI, R.; CAZA, T.; WOODFORD, M. R.; REEDER, J. E. *et al.* Valproic Acid Alters Angiogenic and Trophic Gene Expression in Human Prostate Cancer Models. **Anticancer Res**, 36, n. 10, p. 5079-5086, 10 2016.
- CHEN, C. H.; CHANG, Y. J.; KU, M. S.; CHUNG, K. T. *et al.* Enhancement of temozolomide-induced apoptosis by valproic acid in human glioma cell lines through redox regulation. **J Mol Med (Berl)**, 89, n. 3, p. 303-315, Mar 2011.
- CHEN, X.; WONG, P.; RADANY, E.; WONG, J. Y. HDAC inhibitor, valproic acid, induces p53-dependent radiosensitization of colon cancer cells. **Cancer Biother Radiopharm**, 24, n. 6, p. 689-699, Dec 2009.
- CHIE, E. K.; SHIN, J. H.; KIM, J. H.; KIM, H. J. *et al.* In Vitro and In Vivo Radiosensitizing Effect of Valproic Acid on Fractionated Irradiation. **Cancer Res Treat**, 47, n. 3, p. 527-533, Jul 2015.
- CHOI, P. J.; TUBBS, R. S.; OSKOUIAN, R. J. Emerging Cellular Therapies for Glioblastoma Multiforme. **Cureus**, 10, n. 3, p. e2305, Mar 11 2018.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J**, 17, n. 10, p. 1195-1214, Jul 2003.
- CURTIUS, K.; WRIGHT, N. A.; GRAHAM, T. A. An evolutionary perspective on field cancerization. **Nat Rev Cancer**, 18, n. 1, p. 19-32, Jan 2018.
- DAS, C. M.; AGUILERA, D.; VASQUEZ, H.; PRASAD, P. *et al.* Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. **J Neurooncol**, 85, n. 2, p. 159-170, Nov 2007.

- DAVIS, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clin J Oncol Nurs**, 20, n. 5 Suppl, p. S2-8, 10 01 2016.
- DE SOUZA, C.; CHATTERJI, B. P. HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, 10, n. 2, p. 145-162, 2015.
- DEBELA, D. T.; MUZAZU, S. G.; HERARO, K. D.; NDALAMA, M. T. *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. **SAGE Open Med**, 9, p. 20503121211034366, 2021.
- DINICOLANTONIO, J. J.; O'KEEFE, J. H. Magnesium and Vitamin D Deficiency as a Potential Cause of Immune Dysfunction, Cytokine Storm and Disseminated Intravascular Coagulation in covid-19 patients. **Mo Med**, 118, n. 1, p. 68-73, 2021 Jan-Feb 2021.
- DIORI KARIDIO, I.; SANLIER, S. H. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. **J Egypt Natl Canc Inst**, 33, n. 1, p. 32, Nov 01 2021.
- DOS SANTOS, S. C.; SÁ-CORREIA, I. Yeast toxicogenomics: lessons from a eukaryotic cell model and cell factory. **Curr Opin Biotechnol**, 33, p. 183-191, Jun 2015a.
- EKI, T. Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress responses: a 40-year overview. **Appl Microbiol Biotechnol**, 102, n. 6, p. 2493-2507, Mar 2018.
- EL-FAHAM, A. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Schiff Base Series of Valproyl, N-Valproyl Glycinyll, and N-Valproyl-4-aminobenzoyl Hydrazide Derivatives. **Chem. Pharm. Bull**, v. 62, n. 6, p. 591–599, 2014.

- ELIODÓRIO, K. P.; CUNHA, G. C. G. E.; MÜLLER, C.; LUCARONI, A. C. *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. **Adv Appl Microbiol**, 109, p. 61-119, 2019.
- EYAL, S. *et al.* Histone deacetylases inhibition and tumor cells cytotoxicity by CNS-active VPA constitutional isomers and derivatives. *Biochemical Pharmacology*, v. 69, n. 10, p. 1501–1508, 15 maio 2005.
- FAY, M. F.; HEAD, R.; SMINIA, P.; DOWSON, N. *et al.* Valproate in Adjuvant Glioblastoma Treatment. **J Clin Oncol**, 34, n. 25, p. 3105-3107, 09 01 2016.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLEES, J. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26, n. 1, p. 125-132, Jan 2011.
- FOWLER, P.; SMITH, K.; YOUNG, J.; JEFFREY, L. *et al.* Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. **Mutat Res**, 742, n. 1-2, p. 11-25, Feb 18 2012.
- GOODWIN, J. F.; KNUDSEN, K. E. Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. **Cancer Discov**, 4, n. 10, p. 1126-1139, Oct 2014.
- GRÖBER, U.; SCHMIDT, J.; KISTERS, K. Magnesium in Prevention and Therapy. **Nutrients**, 7, n. 9, p. 8199-8226, Sep 23 2015.
- GRÜNSPAN, L. D.; MUSSULINI, B. H. M.; BAGGIO, S.; DOS SANTOS, P. R. *et al.* Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebrafish. **Epilepsy Res**, 139, p. 171-179, 01 2018.

- GUERRERA, M. P.; VOLPE, S. L.; MAO, J. J. Therapeutic uses of magnesium. **Am Fam Physician**, 80, n. 2, p. 157-162, Jul 15 2009.
- GUINTINI, L.; CHARTON, R.; PEYRESAUBES, F.; THOMA, F. *et al.* Nucleosome positioning, nucleotide excision repair and photoreactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair (Amst)**, 36, p. 98-104, Dec 2015.
- HAN, W.; GUAN, W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. **Front Oncol**, 11, p. 687362, 2021.
- HAN, W.; YU, F.; CAO, J.; DONG, B. *et al.* Valproic Acid Enhanced Apoptosis by Promoting Autophagy Via Akt/mTOR Signaling in Glioma. **Cell Transplant**, 29, p. 963689720981878, 2020 Jan-Dec 2020.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 04 2011.
- HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411, n. 6835, p. 366-374, May 17 2001.
- HOPPE, B. S.; JENSEN, R. B.; KIRCHGESSNER, C. U. Complementation of the radiosensitive M059J cell line. **Radiat Res**, 153, n. 2, p. 125-130, Feb 2000.
- HWANG, B.; LEE, J. H.; BANG, D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. **Exp Mol Med**, 50, n. 8, p. 1-14, 08 07 2018.
- IBRAHIM, T. S.; SHEHA, T. A.; ABO-DYA, N. E.; ALAWADH, M. A. *et al.* Design, synthesis and anticancer activity of novel valproic acid conjugates with improved histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity. **Bioorg Chem**, 99, p. 103797, 06 2020.

- ISHIGURO, Y.; KOBAYASHI, M.; IDENO, M.; NARUMI, K. *et al.* Valproate sensitizes human glioblastoma cells to 3-bromopyruvate-induced cytotoxicity. **Int J Pharm**, 551, n. 1-2, p. 97-102, Nov 15 2018.
- JOHANNESSEN, T. C.; BJERKVIG, R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Expert Rev Anticancer Ther**, 12, n. 5, p. 635-642, May 2012.
- KALAL, B. S.; PAI, V. R.; BEHERA, S. K.; SOMASHEKARAPPA, H. M. HDAC2 Inhibitor Valproic Acid Increases Radiation Sensitivity of Drug-Resistant Melanoma Cells. **Med Sci (Basel)**, 7, n. 3, Mar 22 2019.
- KALANTAR, H.; RASHIDI, M.; KALANTAR, M.; TAVALLAEI, M. *et al.* Anticancer Effects of Valproic Acid via Regulation of Epigenetic Mechanisms in Non-small-cell Lung Cancer A549 Cell Line. **Iran J Pharm Res**, 20, n. 1, p. 133-140, 2021.
- KAVALIAUSKAITĖ, D.; STAKIŠAITIS, D.; MARTINKUTĖ, J.; ŠLEKIENĖ, L. *et al.* The Effect of Sodium Valproate on the Glioblastoma U87 Cell Line Tumor Development on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and on EZH2 and p53 Expression. **Biomed Res Int**, 2017, p. 6326053, 2017.
- KERKHOF, M.; DIELEMANS, J. C.; VAN BREEMEN, M. S.; ZWINKELS, H. *et al.* Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme. **Neuro Oncol**, 15, n. 7, p. 961-967, Jul 2013.
- KHANI, S.; HEJAZI, S. A.; YAGHOUBI, M.; SHARIFIPOUR, E. Comparative study of magnesium, sodium valproate, and concurrent magnesium-sodium valproate therapy in the prevention of migraine headaches: a randomized controlled double-blind trial. **J Headache Pain**, 22, n. 1, p. 21, Apr 07 2021.

- KOWALSKI, T. W.; LORD, V. O.; SGARIONI, E.; GOMES, J. D. A. *et al.* Transcriptome meta-analysis of valproic acid exposure in human embryonic stem cells. **Eur Neuropsychopharmacol**, 60, p. 76-88, 07 2022.
- KRAHN, D. F. Chinese hamster cell mutagenesis: a comparison of the CHO and V79 systems. **Ann N Y Acad Sci**, 407, p. 231-238, 1983.
- LE MAY, N.; EGLY, J. M.; COIN, F. True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. **J Nucleic Acids**, 2010, Jul 25 2010.
- LENG, Y.; WANG, J.; WANG, Z.; LIAO, H. M. *et al.* Valproic Acid and Other HDAC Inhibitors Upregulate FGF21 Gene Expression and Promote Process Elongation in Glia by Inhibiting HDAC2 and 3. **Int J Neuropsychopharmacol**, 19, n. 8, 08 2016.
- LEVINE, A. J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. **Nat Rev Cancer**, 20, n. 8, p. 471-480, 08 2020.
- LI, J.; SUN, H.; HUANG, Y.; WANG, Y. *et al.* Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 51, n. 9, p. 879-889, Sep 06 2019a.
- LI, L. J.; CHONG, Q.; WANG, L.; CHER, G. B. *et al.* Different treatment efficacies and side effects of cytotoxic chemotherapy. **J Thorac Dis**, 12, n. 7, p. 3785-3795, Jul 2020.
- LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. **Annu Rev Biochem**, 79, p. 181-211, 2010.

- LIU, Y. Q.; WU, F.; LI, J. J.; LI, Y. F. *et al.* Gene Expression Profiling Stratifies IDH-Wildtype Glioblastoma With Distinct Prognoses. **Front Oncol**, 9, p. 1433, 2019.
- LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. **Emerg Med Clin North Am**, 32, n. 1, p. 167-203, Feb 2014.
- LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, 131, n. 6, p. 803-820, 06 2016.
- LU, V. M.; TEXAKALIDIS, P.; MCDONALD, K. L.; MEKARY, R. A. *et al.* The survival effect of valproic acid in glioblastoma and its current trend: a systematic review and meta-analysis. **Clin Neurol Neurosurg**, 174, p. 149-155, 11 2018.
- MAKITA, N.; NINOMIYA, I.; TSUKADA, T.; OKAMOTO, K. *et al.* Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells. **Oncol Rep**, 34, n. 3, p. 1185-1192, Sep 2015.
- MANTHOU, M. E.; MEDITSKOU, S.; LYKARTSIS, C.; SAPALIDIS, K. *et al.* The role of neuronal apoptosis in Valproic Acid brain-related teratogenesis: a histochemical and immunohistochemical study in BALB/c mice. **Rom J Morphol Embryol**, 61, n. 3, p. 813-819, 2020 Jul-Sep 2020.
- MAREŠ, P.; KUBOVÁ, H.; HEN, N.; YAGEN, B. *et al.* Derivatives of valproic acid are active against pentetrazol-induced seizures in immature rats. **Epilepsy Res**, 106, n. 1-2, p. 64-73, Sep 2013.
- MARONGIU, F.; SERRA, M.; LACONI, E. Development versus Evolution in Cancer Biology. **Trends Cancer**, 4, n. 5, p. 342-348, 05 2018.

- MATUO, R.; SOUSA, F. G.; SOARES, D. G.; BONATTO, D. et al. Saccharomyces cerevisiae as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol*, 70, n. 4, p. 491-502, Oct 2012.
- MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. *Chemical Communications*, n. 9, p. 1001, 7 mar. 2009
- MEKONNEN, S. Valproic Acid Poisoning. *J Emerg Nurs*, 45, n. 1, p. 98-100, Jan 2019.
- MISHRA, M. K.; KUKAL, S.; PAUL, P. R.; BORA, S. et al. Insights into Structural Modifications of Valproic Acid and Their Pharmacological Profile. *Molecules*, 27, n. 1, Dec 24 2021.
- TUNG, E. W.; WINN, L. M. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 248, n. 3, p. 201-209, Nov 01 2010.
- NANAU, R. M.; NEUMAN, M. G. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem*, 46, n. 15, p. 1323-1338, Oct 2013.
- NEUMAN, M. G.; SHEAR, N. H.; JACOBSON-BROWN, P. M.; KATZ, G. G. et al. CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem*, 34, n. 3, p. 211-218, May 2001.
- OLIVIER, C.; OLIVER, L.; LALIER, L.; VALLETTE, F. M. Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. *Front Mol Biosci*, 7, p. 620677, 2020.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 473: In vitro mammalian chromosomal aberration test. Paris: OECD, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 487:
IN VITRO MAMMALIAN CELL MICRONUCLEUS TEST. Paris: OECD,
2014.

OU, A.; YUNG, W. K. A.; MAJD, N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance
in Glioblastoma. **Int J Mol Sci**, 22, n. 1, Dec 31 2020.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A. S.; HATZILOUKAS, E. and its
industrial applications. **AIMS Microbiol**, 6, n. 1, p. 1-31, 2020.

PATEL, B. M.; RAGHUNATHAN, S.; PORWAL, U. Cardioprotective effects of
magnesium valproate in type 2 diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol**, 728, p. 128-
134, Apr 05 2014.

PENG, X.; YAN, Y.; CHEN, R.; WANG, X. *et al.* Long-term safety, tolerability, and
efficacy of magnesium valproate versus sodium valproate in acute seizures. **Curr
Med Res Opin**, 36, n. 2, p. 271-276, 02 2020.

PHILBROOK, N. A.; NIKOLOVSKA, A.; MACIVER, R. D.; BELANGER, C. L. *et
al.* Characterizing the effects of in utero exposure to valproic acid on murine fetal
heart development. **Birth Defects Res**, 111, n. 19, p. 1551-1560, 11 15 2019.

PICH, C.T.; DOS SANTOS, P.R.; FORTUNATO, T.V.O.; CHIARELLO, M. *et al.*
Mixed Ternary Mononuclear Copper(II) Complexes Based on Valproic Acid with
1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands: dna interaction and
cytotoxicity in v79 cells. *J. Braz. Chem. Soc* 30(3) (2019) 597-613.

PICKERING, G.; MAZUR, A.; TROUSSELARD, M.; BIENKOWSKI, P. *et
al.* Magnesium Status and Stress: The Vicious Circle Concept
Revisited. **Nutrients**, 12, n. 12, Nov 28 2020.

- PRAJAPATI, H.; KANSAL, D.; NEGI, R. Magnesium valproate-induced pedal edema on chronic therapy: A rare adverse drug reaction. **Indian J Pharmacol**, 49, n. 5, p. 399-400, 2017 Sep-Oct 2017.
- RAGHUNATHAN, S.; GOYAL, R. K.; PATEL, B. M. Selective inhibition of HDAC2 by magnesium valproate attenuates cardiac hypertrophy. **Can J Physiol Pharmacol**, 95, n. 3, p. 260-267, Mar 2017.
- REVILLA-PACHECO, F.; RODRÍGUEZ-SALGADO, P.; BARRERA-RAMÍREZ, M.; MORALES-RUIZ, M. P. *et al.* Extent of resection and survival in patients with glioblastoma multiforme: Systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, 100, n. 25, p. e26432, Jun 25 2021.
- RIVA, G.; CILIBRASI, C.; BAZZONI, R.; CADAMURO, M. *et al.* Valproic Acid Inhibits Proliferation and Reduces Invasiveness in Glioma Stem Cells Through Wnt/ β Catenin Signalling Activation. **Genes (Basel)**, 9, n. 11, Oct 26 2018.
- ROBERTSON, A. B.; KLUNGLAND, A.; ROGNES, T.; LEIROS, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci**, 66, n. 6, p. 981-993, Mar 2009.
- RODRIGUES, G. B.; DOS SANTOS SILVEIRA, P.; MACHADO, M.; GUECHEVA, T. N. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by mixed ternary mononuclear Cu(II) complexes based on valproic acid with 1,10-phenanthroline or 2,2'- bipyridine ligands. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, 868-869, p. 503390, 2021 Aug-Sep 2021.

- ROMOLI, M.; MAZZOCCHETTI, P.; D'ALONZO, R.; SILIQUINI, S. *et al.* Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. **Curr Neuropharmacol**, 17, n. 10, p. 926-946, 2019.
- SAINI, J.; SHARMA, P. K. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. **Curr Drug Targets**, 19, n. 13, p. 1478-1490, 2018.
- SANTINI, C. *et al.* Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 8 jan. 2014.
- SEREFKO, A.; SZOPA, A.; POLESZAK, E. Magnesium and depression. **Magnes Res**, 29, n. 3, p. 112-119, Mar 01 2016.
- SHARMA, A.; ALMASAN, A. Autophagy and PTEN in DNA damage-induced senescence. **Adv Cancer Res**, 150, p. 249-284, 2021.
- SILVA, E. F.; SANTOS, P. R.; ANTUNES, K. H.; FRANCESCHINA, C. M.; FREITAS, D. N.; KONRAD, P.; ZANIN, R. F.; MACHADO, P.; MOURA, S.; SOUZA, A. P. D. Anti-tumor effects of valproate zinc complexes on a lung cancer cell line. **Polyhedron**, p. 115415, nov. 2021.
- SIXTO-LÓPEZ, Y.; BELLO, M.; CORREA-BASURTO, J. Exploring the inhibitory activity of valproic acid against the HDAC family using an MMGBSA approach. **J Comput Aided Mol Des**, 34, n. 8, p. 857-878, 08 2020.
- SPIVAK, G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst)*, 36, p. 13-18, Dec 2015.
- STAR, K.; EDWARDS, I. R.; CHOONARA, I. Valproic acid and fatalities in children: a review of individual case safety reports in Vigibase. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e108970, 2014.

- STOYANOV, G. S.; DZHENKOV, D.; GHENEV, P.; ILIEV, B. *et al.* Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. **Med Oncol**, 35, n. 3, p. 27, Jan 31 2018.
- SUN, J.; PIAO, J.; LI, N.; YANG, Y. *et al.* Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. **FEBS J**, 287, n. 10, p. 2118-2133, 05 2020.
- SYLLA-IYARRETA VEITÍA, M. *et al.* Synthesis, structural analysis and anticonvulsant activity of a ternary Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1286–1293, out. 2009.
- SZULCZYK, B.; NUROWSKA, E. Valproic acid inhibits TTX-resistant sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. **Biochem Biophys Res Commun**, 491, n. 2, p. 291-295, 09 16 2017.
- TAN, A. C.; ASHLEY, D. M.; LÓPEZ, G. Y.; MALINZAK, M. *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA Cancer J Clin**, 70, n. 4, p. 299-312, 07 2020.
- TAN, C. W.; HO, L. P.; KALIMUDDIN, S.; CHERNG, B. P. Z. *et al.* Cohort study to evaluate the effect of vitamin D, magnesium, and vitamin B. **Nutrition**, 79-80, p. 111017, 2020 Nov - Dec 2020.
- TANG, C. F.; DING, H.; JIAO, R. Q.; WU, X. X. *et al.* Possibility of magnesium supplementation for supportive treatment in patients with COVID-19. **Eur J Pharmacol**, 886, p. 173546, Nov 05 2020.

- TOMCZAK, K.; CZERWIŃSKA, P.; WIZNEROWICZ, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. **Contemp Oncol (Pozn)**, 19, n. 1A, p. A68-77, 2015.
- TOMSON, T.; BATTINO, D.; PERUCCA, E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. **Lancet Neurol**, 15, n. 2, p. 210-218, 02 2016.
- TRAN, L. N. K.; KICHENADASSE, G.; MOREL, K. L.; LAVRANOS, T. C. *et al.* The Combination of Metformin and Valproic Acid Has a Greater Anti-tumoral Effect on Prostate Cancer Growth. **In Vivo**, 33, n. 1, p. 99-108, 2019 Jan-Feb 2019.
- TRAPANI, V.; ROSANOFF, A.; BANIASADI, S.; BARBAGALLO, M. *et al.* The relevance of magnesium homeostasis in COVID-19. **Eur J Nutr**, 61, n. 2, p. 625-636, Mar 2022.
- TSAI, H. C.; WEI, K. C.; TSAI, C. N.; HUANG, Y. C. *et al.* Effect of valproic acid on the outcome of glioblastoma multiforme. **Br J Neurosurg**, 26, n. 3, p. 347-354, Jun 2012.
- TSENG, J. H.; CHEN, C. Y.; CHEN, P. C.; HSIAO, S. H. *et al.* Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression. **Oncotarget**, 8, n. 9, p. 14666-14679, Feb 28 2017.
- VAUBEL, R. A.; TIAN, S.; REMONDE, D.; SCHROEDER, M. A. *et al.* Genomic and Phenotypic Characterization of a Broad Panel of Patient-Derived Xenografts Reflects the Diversity of Glioblastoma. **Clin Cancer Res**, 26, n. 5, p. 1094-1104, 03 01 2020.

- VEITÍA, S.I.M.; DUMAS, F.; MORGANT, G. US Patent Application Publication, S. Veitia, F. Dumas, G. Morgant, US Patent 2012/0142658A1, 2012.
- VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, 17, n. 1, p. 98-110, Jan 19 2010.
- VERROTTI, A.; SCAPARROTTA, A.; GROSSO, S.; CHIARELLI, F. *et al.* Anticonvulsant drugs and hematological disease. **Neurol Sci**, 35, n. 7, p. 983-993, Jul 2014.
- VIDAURRE, J.; GEDELA, S.; YAROSZ, S. Antiepileptic Drugs and Liver Disease. **Pediatr Neurol**, 77, p. 23-36, Dec 2017.
- VOLPE, S. L. Magnesium in disease prevention and overall health. **Adv Nutr**, 4, n. 3, p. 378S-383S, May 01 2013.
- WAWRUSZAK, A.; HALASA, M.; OKON, E.; KUKULA-KOCH, W. *et al.* Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art in 2021. **Cancers (Basel)**, 13, n. 14, Jul 07 2021.
- WHO (World Health Organization), Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food (Chapter 4, second edition). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria 240. FAO/WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 2020.
- WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 5, 05 02 2016.

- WIRSCHING, H. G.; GALANIS, E.; WELLER, M. Glioblastoma. **Handb Clin Neurol**, 134, p. 381-397, 2016.
- WITTHAYANUWAT, S.; PESEE, M.; SUPAADIREK, C.; SUPAKALIN, N. *et al.* Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. **Asian Pac J Cancer Prev**, 19, n. 9, p. 2613-2617, Sep 26 2018.
- WU, G.; NAN, C.; ROLLO, J. C.; HUANG, X. *et al.* Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase. **J Biomed Sci**, 17, p. 16, Mar 10 2010.
- WU, W.; KLOCKOW, J. L.; ZHANG, M.; LAFORTUNE, F. *et al.* Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacol Res**, 171, p. 105780, 09 2021.
- WYRICK, J. J.; ROBERTS, S. A. Genomic approaches to DNA repair and mutagenesis. **DNA Repair (Amst)**, 36, p. 146-155, Dec 2015.
- XU, Y.; XU, D. Repair pathway choice for double-strand breaks. **Essays Biochem**, 64, n. 5, p. 765-777, 10 26 2020.
- YANG, J.; SUN, X.; MAO, W.; SUI, M. *et al.* Conjugate of Pt(IV)-histone deacetylase inhibitor as a prodrug for cancer chemotherapy. **Mol Pharm**, 9, n. 10, p. 2793-2800, Oct 01 2012.
- YANG, L. J.; ZHOU, C. F.; LIN, Z. X. Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. **Cancer Invest**, 32, n. 2, p. 31-36, Feb 2014.
- YANG, W.; GAO, Y. Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism. **Annu Rev Biochem**, 87, p. 239-261, 06 20 2018.

- YUAN, Y.; XIANG, W.; QING, M.; YANHUI, L. *et al.* Survival analysis for valproic acid use in adult glioblastoma multiforme: a meta-analysis of individual patient data and a systematic review. **Seizure**, 23, n. 10, p. 830-835, Nov 2014.
- ZAIMY, M. A.; SAFFARZADEH, N.; MOHAMMADI, A.; POURGHADAMYARI, H. *et al.* New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. **Cancer Gene Ther**, 24, n. 6, p. 233-243, 06 2017.
- ZHANG, C.; LIU, S.; YUAN, X.; HU, Z. *et al.* Valproic Acid Promotes Human Glioma U87 Cells Apoptosis and Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 β Through ERK/Akt Signaling. **Cell Physiol Biochem**, 39, n. 6, p. 2173-2185, 2016.
- ZHU, M. M.; LI, H. L.; SHI, L. H.; CHEN, X. P. *et al.* The pharmacogenomics of valproic acid. **J Hum Genet**, 62, n. 12, p. 1009-1014, Dec 2017.