

**CAROLINA MARIA BERRA**

**ESTUDOS DE REPARO DE DNA POR EXCISÃO DE  
NUCLEOTÍDEOS EM LESÕES OXIDATIVAS EM  
CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciência.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico  
Martins Menck

**São Paulo**

**2008**

## RESUMO

BERRA, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. 2008. 134 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Pulo, São Paulo, 2008.

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é bastante conhecido por reparar lesões causadas por luz ultravioleta (UV). Contudo, algumas evidências vêm mostrando também a sua provável atuação em reparo de lesões oxidativas. Mutações em alguns genes envolvidos em NER estão associadas a doenças genéticas raras clinicamente distintas cujos fenótipos não podem ser explicados simplesmente por deficiência em reparo de lesões UV, mas podem estar associados à deficiência em reparo de lesões oxidativas. No entanto, o mecanismo exato da atuação de NER nesse tipo de lesão ainda permanece bastante controverso. Com o objetivo de uma melhor compreensão do envolvimento do NER em lesões oxidativas foi averiguado os efeitos da foto-excitação do azul de metileno (MB) em DNA plasmidial bem como em células deficientes em NER. Sabe-se que a foto-excitação do MB *in vitro* gera principalmente lesões do tipo 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) em DNA. Assim, DNA plasmidial foi tratado com MB e luz visível e, em seguida, digeridos com a enzima formamidopirimidina(fapi)-DNA glicosilase (FPG) para verificar a presença de sítios sensíveis à esta por eletroforese em gel de agarose. Os resultados mostraram que o DNA plasmidial apresentou mais sítios sensíveis a FPG quando o MB foi foto-excitado, confirmando que MB e luz podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de danificar o DNA. Foi verificado que fibroblastos humanos imortalizados com SV40 proficientes ou deficientes no mecanismo de NER (XP-A e XP-C) puderam incorporar MB de forma semelhante e, dentro das células, o MB pôde gerar oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Foi verificado por imunocitoquímica, que a foto-excitação de diferentes concentrações de MB formou também 8-oxoG em núcleos de fibroblastos. Além disso, foi averiguado por ensaios clonogênicos e por citometria de fluxo, que as células deficientes nos genes *XPA* e *XPC* foram mais sensíveis a foto-excitação do MB do que as células proficientes em NER. Também foi averiguado, por ensaio cometa, que as células deficientes em NER apresentaram mais danos oxidativos em seu DNA genômico do que as células selvagens após tratamento com MB e luz. Contudo, todas as células testadas apresentaram a mesma cinética de reparo das lesões geradas após o tratamento. Além disso, houve mais marcação de  $\gamma$ -H2AX em células mutantes no gene *XPA* e *XPC* após a foto-excitação do MB, sugerindo maior susceptibilidade dessas linhagens às quebras da molécula de DNA quando comparadas às células proficientes em NER. Desta forma, os resultados sugerem que a excitação por luz visível do MB gera danos oxidativos e quebras na molécula de DNA, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que as proteínas *XPA* e *XPC* podem ter algum papel na proteção desse estresse, além da sua sabida participação em reparo de lesões induzidas por luz UV.

Palavras-chave: Reparo de DNA. Lesões oxidativas. Fotossensibilização.

## ABSTRACT

BERRA, C. M. The involvement of nucleotide excision repair in DNA oxidative lesions in mammals cells. 2008. 134 f. PhD Thesis (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Pulo, São Paulo, 2008.

Nucleotide excision repair (NER) mechanism is well known to be involved in the removal of UV-induced lesions. However, the participation of this repair mechanism in oxidative DNA lesions is still controversial. Few data indicate that NER-deficient cells have problems to recognize and remove oxidized guanines, suggesting the involvement of this pathway in oxidative lesion repair. In order to study the participation of NER mechanisms in the removal of oxidative DNA lesions, we examined the effects of photoactivated methylene blue (MB) directly in plasmidial DNA as well as in NER-deficient cells. MB photoactivation is known to produce mainly 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoG) damage after *in vitro* DNA treatment. To confirm these data, plasmid DNA was treated *in vitro* with MB and light and then analyzed by electrophoresis for the presence of sites cleaved by FPG, a glycosylase that recognizes and cleaves DNA at certain damaged bases, including 8-oxoG. The results show that the plasmid DNA presents more FPG sensitive sites when MB was photoactivated than non-photoactivated, confirming that MB and light can produce oxygen free radicals (ROS) that can damage DNA. *In vivo* assays using wild type human fibroblast cultured cells or NER-deficient (XP-A and XP-C) showed that MB can be similarly incorporated in all cells tested. Moreover, the photoactivation is able to generate singlet oxygen ( $^1O_2$ ) inside cells. We also detected the presence of 8-oxoG in genomic DNA of cells treated with MB and light by immunohistochemistry using an antibody anti-8-oxoG. We performed an *in vivo* assay treating cells with MB and light to verify the induction of oxidative lesion in genomic DNA. Data show that XP-A and XP-C deficient cells are more sensitive to photoactivated MB-induced damage than wild type cells by clonogenic survival assay and flow cytometry. In addition, using alkaline comet assay, XP-A and XP-C cells were found to have more oxidative DNA lesions after MB and light treatment than wild type cells. However, there is a clear similarity in repair kinetic between proficient and deficient cells line, but there are more  $\gamma$ -H2AX *foci* in XP-A and XP-C cells after MB photoactivation suggesting more susceptibility of DNA strand breaks of these cells lines when compared to NER-proficient cells. Therefore, these results suggest that photoactivated MB generates oxidative damage and DNA strand breaks both *in vitro* and *in vivo* assays and that XPA and XPC proteins may also have a role in the protection of cellular oxidative stress, in addition to its participation in repair of UV-induced DNA damage.

Key words: DNA repair. Oxidative lesions. Photo excitation.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Agentes capazes de danificar a molécula de DNA

O DNA é uma complexa molécula orgânica responsável pelas informações genéticas das células dos organismos. Para que essas informações sejam transmitidas com sucesso de geração para geração, a integridade do DNA deve ser mantida. Contudo, apesar de sua considerável estabilidade química, estudos sobre o seu metabolismo mostraram a dinamicidade da molécula (FRIEDBERG, 2003) e que a exposição constante a diversos agentes podem produzir uma variedade bastante grande de lesões na sua estrutura (Figura 1). Essas lesões podem afetar mecanismos celulares essenciais como a replicação do DNA e sua transcrição em RNA. Como consequência, danos no DNA podem produzir na célula efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxico (morte celular), dependendo da natureza dessas lesões e, conseqüentemente, instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (DE BOER *et al.*, 2000).

Durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas na sua estrutura que comprometam o seu bom funcionamento, como por exemplo, desemparelhamento de bases. Outro exemplo é a perda do grupo amino presente em três das quatro bases do DNA (citosina, adenina e guanina). Essa perda ocorre espontaneamente em reações dependentes do pH e da temperatura, caso estes se encontrem alterados (HOEIJMAKERS, 2001). Alguns dos produtos decorrentes da desaminação podem resultar em alteração de bases no DNA e que, durante a sua replicação, geram mutações definitivas. Apesar das mutações serem essenciais quando se pensa em processos evolutivos, são antes de tudo deletérias aos sistemas biológicos. Podem ocorrer, ainda, perda das bases do DNA, especialmente em pHs ácidos gerando sítios abásicos (APs) (apurínico / apirimidínico) (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

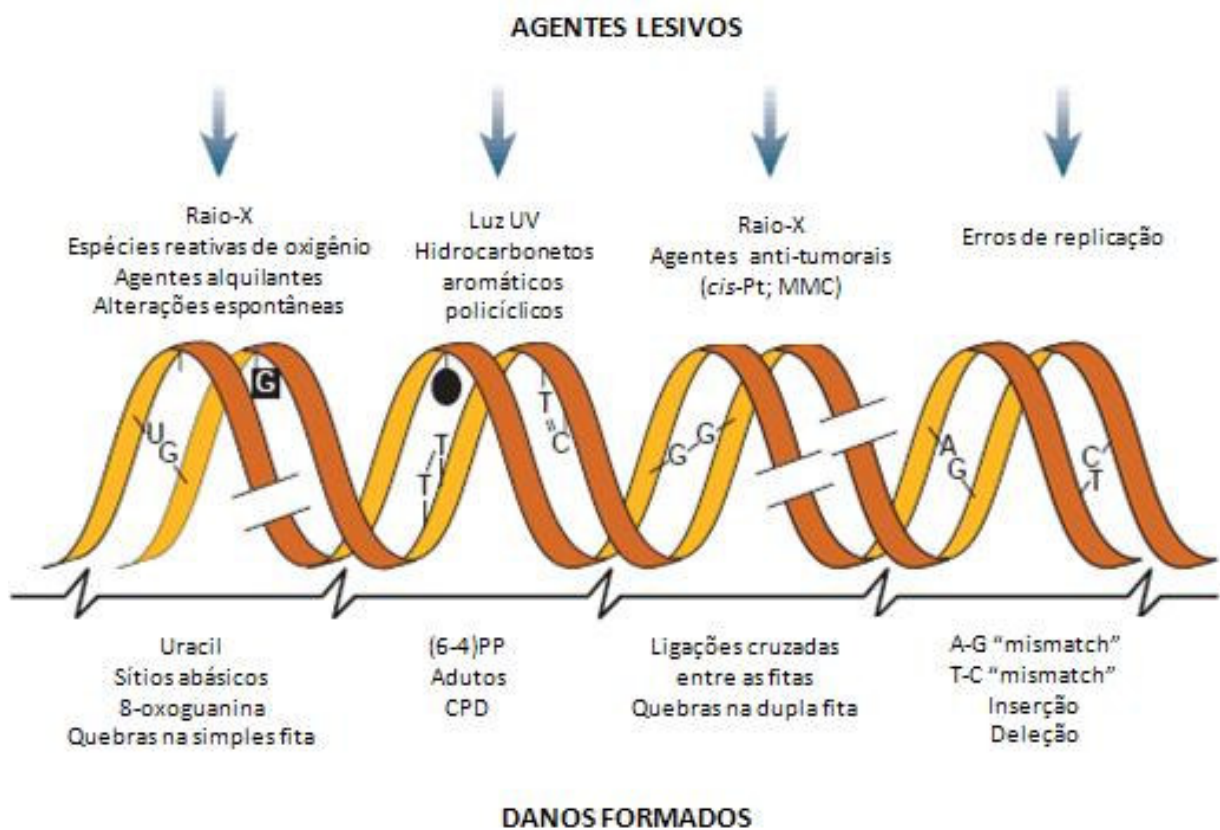


Figura 1: Esquema ilustrativo de agentes comuns que podem danificar o DNA e exemplos de lesões no DNA induzidas por esses agentes. Abreviações: *cis*-Pt e MMC, cisplatina e mitomicina-C, respectivamente (ambos agentes de ligações cruzadas com DNA); 6-4(PP) e CPD, 6-4 fotoprodutos e dímeros de pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). Adaptada de (HOEIJMAKERS, 2001).

Além de alterações espontâneas, modificações induzidas por inúmeros agentes químicos e físicos, provenientes do próprio metabolismo celular ou do ambiente em que os organismos vivem, também podem atuar de maneira significativa na desorganização da estrutura da molécula de DNA.

Alguns agentes químicos que podem causar danos ao DNA são os agentes alquilantes, muitos dos quais são utilizados como quimioterápicos no tratamento de muitos tumores (KAINA *et al.*, 2007). Esses compostos químicos possuem alta afinidade com moléculas orgânicas e muitos já foram comprovados por serem carcinogênicos. Além disso, intermediários do próprio metabolismo normal da célula, como por exemplo, S-adenosyl-metionina, também demonstraram ter capacidade de alquilar o DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

A radiação ionizante (IR) é uma das maiores fontes naturais de agentes físicos que pode causar danos em todos os componentes celulares dos organismos e, no DNA, induzir uma enorme variedade de lesões, como quebra da simples fita (SSBs) (“*Single Strand Breaks*”), quebra da dupla fita (DSBs) (“*Double Strand Breaks*”), ligações cruzadas entre proteína-DNA e várias modificações das bases (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Historicamente, contudo, os estudos dos mecanismos de reparo de lesões no DNA surgiram a partir das investigações de danos gerados por radiação ultravioleta (UV), devido à facilidade em reproduzir e medir esse tipo de sistema (CALLEGARI *et al.*, 2007). Além disso, a luz UV é de grande relevância biológica, uma vez que, desde o começo da evolução da vida no planeta, a maioria dos organismos convive com os efeitos genotóxicos gerados pela luz solar (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Isso ocorre porque as bases do DNA são capazes de absorver diretamente os fótons provenientes de comprimentos de ondas curtas (RAVANAT *et al.*, 2001). Quando o DNA é exposto à luz UV-C (200 a 280 nm) ou UV-B (280 a 320 nm), pirimidinas adjacentes podem se ligar covalentemente gerando, principalmente, dímeros de pirimidina cis-sin-ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs), lesões que causam distorção na dupla hélice do DNA (YOU *et al.*, 2001; SCHUL *et al.*, 2002). A formação de lesões oxidativas nas bases do DNA após exposição à luz UV-B também já foi relatada, mas em uma proporção muito menor do que a dos dímeros de pirimidina (RAVANAT *et al.*, 2001). A absorção de fótons no comprimento de onda da luz UV-A (320 a 400 nm) pelo DNA é muito baixa, mas pode excitar cromóforos endógenos e causar lesões de forma indireta, via geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (“*Reactive Oxygen Species*”) (RAVANAT *et al.*, 2001). No entanto, alguns autores mostraram que CPDs também podem ser formados nesse comprimento de onda (DOUKI *et al.*, 2003).

Dentro das células também podem ser produzidas substâncias lesivas originadas como consequência do próprio metabolismo celular. Uma parte do oxigênio (O<sub>2</sub>) consumido pelas células aeróbicas pode gerar ROS, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem reagir com várias moléculas intracelulares (HALLIWELL *et al.*, 1999). ROS são também produzidas durante processos patológicos, como, por exemplo, o que ocorre numa resposta inflamatória celular. Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores como: o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons

metálicos associados a essa biomolécula (EVANS *et al.*, 2004). No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos das células via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA e lesões nessa molécula, se não reparadas, podem levar a sérias conseqüências celulares.

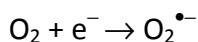
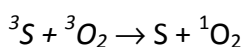
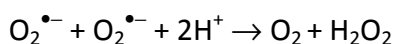
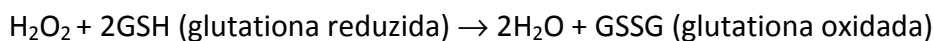
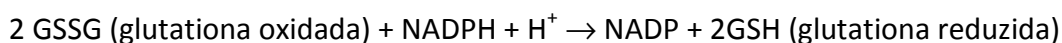
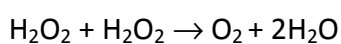
## 1.2 Geração de ROS dentro das células

É importante salientar que ROS nem sempre são conseqüência do metabolismo celular, mas podem ser também geradas pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular (BARZILAI *et al.*, 2004). Em geral, deve-se notar que a geração intracelular de ROS, considerada normal em níveis fisiológicos, quando não é necessariamente lesiva, tem um importante papel vital, uma vez que essas espécies, nesses casos produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI *et al.*, 2004).

ROS é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio, que são aquelas espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, como radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (HALLIWELL *et al.*, 1999) exemplificados na Tabela 1.

As espécies moderadamente reativas como  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando em contato com alguns componentes celulares, como o íon ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), por exemplo, geram  $\cdot\text{OH}$ , um produto bastante reativo (MARTINEZ, 2003). Essas ROS podem atacar o DNA e produzir danos oxidativos em suas bases, ou até causar quebra da molécula. Além disso, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , juntamente com os radicais livres e o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$  - gerado fisiologicamente na célula) reagem para formar o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um potente agente citotóxico (HEMNANI *et al.*, 1998). Mais ainda, os radicais livres podem oxidar moléculas de lipídeos e proteínas gerando intermediários reativos que reagem com o DNA e formam adutos com essa molécula (MARNETT, 2000).

Tabela 1: Exemplos de geração e desativação enzimática de ROS

**Geração de ROS***Geração de radical superóxido**Geração de radical hidroxila - Reação de Fenton**Geração de oxigênio singlete por fotossensibilização Tipo II***Proteção contra ROS***Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)**Glutathione Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)**Glutathione Redutase (GRd – fora do peroxissoma)**Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)*

Abreviações: S, fotossensibilizador no estado fundamental;  ${}^3\text{S}$ , fotossensibilizador no estado triplete excitado;  ${}^3\text{O}_2$ , estado triplete do oxigênio. Adaptada de (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; BERRA *et al.*, 2006).

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem:

- (i) Enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GRd), glutathione peroxidase (GPx) e catalases (CAT) (Tabela 1);



- (ii) Proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais quais íons ferro e íons cobre, como por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas;
- (iii) Proteínas que protegem processos celulares contra os danos oxidativos através de outros mecanismos não enzimáticos, como por exemplo, as proteínas de estresse (“stress proteins”);
- (iv) Moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar ROS via auto-oxidação, como por exemplo, glutathione e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e  $\beta$ -caroteno.

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando a geração de ROS excede a capacidade antioxidante celular, pode haver a formação de uma condição conhecida como “estresse oxidativo”, cujos resultados podem ser bastante danosos às células. Essa condição pode variar bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada.

### 1.3 Oxigênio singlete

O estado mais estável da molécula diatômica do oxigênio ( ${}^3\Sigma_g^-O_2$ ) possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado num orbital degenerado distinto, o que confere a sua característica como um agente oxidante, uma vez que pode capturar elétrons de outra molécula (Figura 2). No entanto, esses dois elétrons capturados devem ser de spin antiparalelo para poderem se ajustar aos espaços vazios nos orbitais degenerados. Um par de elétrons num orbital atômico ou molecular não obedeceria este critério, uma vez que de acordo com o princípio de Pauli's, possuem spins opostos (HALLIWELL *et al.*, 1999). Isso impõe uma restrição na transferência de elétrons e tende a fazer com que o oxigênio aceite esses elétrons um de cada vez, o que contribui para explicar porque o oxigênio reage lentamente com muitos compostos não radicalares.

A forma mais reativa do oxigênio conhecida como  ${}^1O_2$  pode ser gerada por uma transferência de energia (mais detalhes a seguir). Existem dois estados de  ${}^1O_2$ , um estado

mais reativo ( $^1\Sigma_g^+O_2$ ) e outro menor reativo ( $^1\Delta_gO_2$ ), sendo que este último não tem um elétron livre e, por definição, não é um radical (Figura 2). O estado  $^1\Sigma_g^+$  do oxigênio rapidamente decai ao estado  $^1\Delta_g$ , assim, somente esta última forma é normalmente considerada nos sistemas biológicos e é muito mais oxidativa do que o oxigênio, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no último orbital e não há a restrição de spin. O  $^1O_2$  em solução pode se desativar por transferir a sua energia excitada ao solvente, assim a sua meia vida depende do solvente em que foi gerado (HALLIWELL *et al.*, 1999).

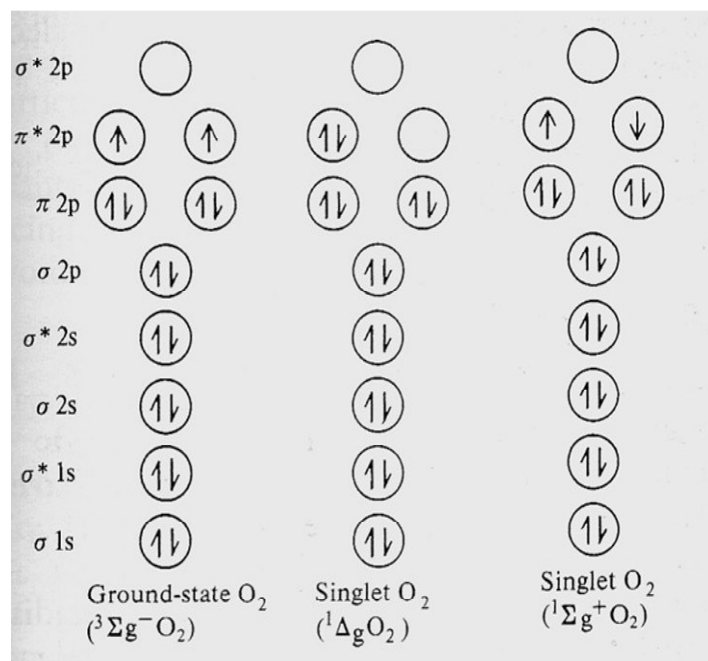


Figura 2: Esquema simplificado das ligações da forma diatômica da molécula de oxigênio e seus derivados. Adaptada de (HALLIWELL *et al.*, 1999).

#### 1.4 Geração de oxigênio singlete via fotossensibilização

Biologicamente, a fotossensibilização é o processo no qual uma molécula, denominada fotossensibilizador, absorve luz visível ou luz UV e subsequentemente produz espécies reativas que alteram moléculas intracelulares (KOCHEVAR *et al.*, 1996). O processo de fotossensibilização ocorre quando um sensibilizador, luz de comprimento de onda apropriado e oxigênio estão presentes simultaneamente (KOCHEVAR *et al.*, 2000).

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

