

TULA CELESTE WILMART GONÇALVES

**Estudo das lesões e mutagênese induzidas por
UV-B em *Escherichia coli***

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação dos professores Claudia de Alencar Santos Lage e Alvaro Augusto da Costa Leitão no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com auxílios concedidos por: CNPq, FAPERJ e CAPES.

Agradecimentos

Aos meus avós Nelson e Áurea por todo amor e carinho dedicados à minha criação.

Muito obrigada!!

Ao vô Gil e vó Andrée por serem um exemplo de luta e perseverança.

À minha mãe Hebe pelo amor e pelas palavras de apoio necessárias nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Ronaldo pelo amor e pelo incentivo aos estudos.

À minha tia Regina por ter contribuído para a minha educação e sempre ter acreditado em mim.

Às minhas irmãzinhas Rosa e Bárbara pelo amor, carinho e compreensão.

À Ana Paula pela sua serenidade e capacidade de acalmar a “fera”.

Ao meu namorado Raoni por todo amor, compreensão e companheirismo. Obrigada pelos sábados, domingos e feriados ao meu lado. Você é um exemplo de dedicação à ciência.

Aos meus orientadores Claudia Lage e Alvaro Leitão por terem me acolhido desde a minha iniciação científica. Obrigada por compartilharem comigo seus conhecimentos e por terem me ensinado a trilhar meu próprio caminho.

À Tatiana pela orientação na minha IC e por todo carinho.

À Janine, minha amiga e braço direito, esquerdo... Obrigada por todas as palavras de força e apoio e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

À Ritinha que sempre tem uma palavra confortante de apoio nos momentos de tensão.

Ao casal Marcelo e Vivi pelas discussões e pelos momentos ‘Barbosa’ de descontração.

À sempre muito educada, Glória pela amizade.

À Claudia Ribeiro por me lembrar momentos que eu nunca vivi!!

Ao Roberto por ser um exemplo de calma e serenidade mesmo nos momentos difíceis.

Aos amigos desde a IC Mariana, Larissa e Marquinho, pela amizade e por compartilharem dos mesmos sentimentos.

Ao Léo pelo auxílio na bancada e pelas piadinhas de última hora.

Ao Elder, um cara muito gente boa, pela amizade!

À Luciana por ser sempre prestativa.

À Bárbara pela amizade e por compartilhar comigo praticamente todos os momentos durante a confecção deste trabalho.

À Juliana pela alegria contagiante.

Ao Ivan pelo exemplo de determinação e pela amizade de outro planeta.

Ao Gabriel pelos momentos *Coca Cola* e amizade.

À nova turma do laboratório, Marina, Carol, Gustavo, Bianca, Artur, Jorge, Jéssica e Elisa pela amizade do dia-a-dia.

Índice de Figuras

Figura 1- Espectro da radiação ultravioleta-----	2
Figura 2- Estruturas químicas das principais lesões geradas pela radiação UV-----	6
Figura 3- Estruturas químicas de algumas bases alteradas por oxidação-----	7
Figura 4- Desaminação de uma citosina gerando a base uracil-----	13
Figura 5- Penetração da radiação UV nas diferentes camadas da pele-----	16
Figura 6- Esquema do mecanismo proposto para o reparo por excisão de nucleotídeos (NER)-----	25
Figura 7- Esquema do mecanismo proposto para o reparo por excisão de bases (BER)-----	31
Figura 8- Esquema do mecanismo proposto para a fotorrestauração enzimática-----	33
Figura 9- Sobrevivência ao UV-B com filtro, UV-B sem filtro e UV-C de cepas deficientes em NER-----	45
Figura 10- Sobrevivência ao UV-B com filtro, UV-B sem filtro e UV-C de cepas deficientes em BER-----	48
Figura 11- Sobrevivência ao UV-B com filtro, UV-B sem filtro e UV-C de cepas deficientes nas duas vias de BER-----	49
Figura 12- Sobrevivência ao UV-B com filtro, UV-B sem filtro e UV-C de cepas duplo mutantes NER/fpg-----	50
Figura 13- Sobrevivência ao UV-B com filtro das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	53
Figura 14- Sobrevivência ao UV-B sem filtro das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	54
Figura 15- Sobrevivência ao UV-C das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	55
Figura 16- Sobrevivência e fotorrestauração após irradiação com UV-B com filtro das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	56
Figura 17- Sobrevivência e fotorrestauração após irradiação sem UV-B com filtro das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	57
Figura 18- Sobrevivência e fotorrestauração após irradiação com UV-C das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----	58

Figura 19- Mutagênese de aquisição de resistência à rifampicina $\text{Rif}^S \rightarrow \text{Rif}^R$ após tratamentos com UV-B com filtro ou UV-C das cepas deficientes em NER, Phr e UDG-----**60**

Figura 20- Mudanças na posição 461 do gene *LacZ* e substituições de base necessárias para restaurar o fenótipo selvagem-----**61**

Figura 21- Mutagênese de reversão $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ após irradiação com UV-B com filtro e UV-C-----**63**

Índice de quadros e tabelas

Tabela 1- Distribuição dos dímeros de pirimidina ciclobutano em DNA irradiado com UV-----	9
Tabela 2- Formação de CPD, 6-4PP e DewarPP no DNA de células expostas ao UV---	9
Quadro 1- Quadro de cepas-----	35
Quadro 2- Quadro de antibióticos-----	37
Quadro 3- Indução de revertentes <i>lac</i> ⁺ quantitativamente analisados como mutantes induzidos por 10 ⁸ células por J.m ⁻² -----	65
Quadro 4- Quadro comparativo geral das respostas de reparo de DNA e mutagenese induzidas pelo UV-----	75

Lista de siglas, abreviaturas e unidades

A- adenina

AP- apurínico ou apirimidínico

ATP- adenosina trifosfato

BER- reparo por excisão de bases

C- citosina

CPD- dímero de pirimidina ciclobutano

Dewar PP- isômero de Dewar

DNA- ácido desoxirribonucléico

DNAmt- DNA mitocondrial

E. coli- *Escherichia coli*

Endo- endonuclease

ERO- espécies reativas de oxigênio

Exo- exonuclease

FADH- dinucleotídeo de flavina-adenina

Fago- bacteriófago

Fpg- formamidopirimidina DNA glicosilase

g- grama

G- guanina

GGR- reparo global do genoma

GS- gelose de superfície

h- hora

J- Joules

kDa- kilo Dalton

l- litro

Lac- lactose

LB- *Lysogenic Broth*

M- molar

mg- miligrama

µg- micrograma

min- minuto

µl- microlitro

ml- mililitro

mm- milímetro

µM- micromolar

mM- milimolar

MMM- meio mínimo

m.o.i- multiplicidade de infecção

MTHF- meteniltetraidrofolato

Mut- mutantes

NER- reparo por excisão de nucleotídeos

NIR- reparo por incisão de nucleotídeos

NK- *natural killer*

nm- nanômetro

N/N₀- fração de sobrevivência

5-OH-citosina- 5-hidroxicitosina

8-oxo-Gua- 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina

pH- potencial hidrogeniônico

Pol- DNA polimerase

6-4-PP- fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona

Rif- rifampicina

RNA- ácido ribonucleico

rpm- rotação por minuto

SSL- luz solar simulada

T- timina

TCR- reparo acoplado à transcrição

U- uracil

UDG- uracil DNA glicosilase

UV- ultravioleta

UV-A- ultravioleta A

UV-B- ultravioleta B

UV-C- ultravioleta C

XP- xeroderma pigmentoso

°C- graus Celsius

%- porcentagem

Resumo

A radiação UV-B causa tanto danos oxidativos quanto lesões diretas no DNA. Neste trabalho, evidenciou-se diferentes vias de reparo de DNA e propriedades mutagênicas distintas de acordo com as regiões do espectro estudadas. A radiação UV-C foi utilizada como controle. Provavelmente, as lesões diretas produzidas por ambas regiões do espectro estudadas são os dímeros de pirimidinas ciclobutano contendo uracil, envolvendo o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) para sua correção. A irradiação de cepas deficientes nos genes que codificam enzimas participantes no reparo por excisão de bases (BER), aponta a indução de lesões semelhantes para ambas as regiões do espectro, além da indução de uma lesão particular após a irradiação com UV-B sem filtro, possivelmente a 5-hidroxiuracil. O UV-B sem filtro (amplo espectro) produz lesões que são substrato para a enzima endonuclease IV, provavelmente atuando no reparo por incisão de nucleotídeos (NIR), prevenindo assim a produção de sítios AP devido à atuação de BER em lesões aglomeradas. Dímeros de pirimidinas ciclobutano aparecem como a principal lesão direta formada pelo UV-B. Estes têm grande participação na mutagênese induzida por este agente, visto que, as cepas que não têm atividade Uracil DNA-glicosilase apresentaram maior frequência de mutagênese de aquisição de resistência à rifampicina quando comparadas às cepas proficientes nessa enzima. Comparando-se o perfil de reversão $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ induzida pelo UV-B com filtro à induzida pelo UV-C, nota-se que há semelhança na mutagênese gerada. No entanto, para o UV-B com filtro observa-se ainda que há um incremento de mutagênese na cepa CC105 (T→A). Tais resultados apontam que há uma similaridade das lesões induzidas pelas duas regiões do espectro estudadas, além de uma possível lesão particular induzida pelo UV-B com filtro, possivelmente a FapyAdenina.

Abstract

UV-B radiation damages DNA both by direct absorption and oxidative processes. Different DNA repair pathways were shown to perform UV-B-induced damage in this work, with associated mutagenic properties, depending on which UV spectral region was used to irradiate *E. coli* cells. For the purpose of comparison, UV-B induced responses were compared with those arisen after exposure to UV-C. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) appear to be the main direct damage induced by both spectral regions, with a classical dependence on Nucleotide Excision Repair pathway. Inactivation of different Base Excision Repair (BER) deficient strains points to similar lesions induced after exposure to both spectral regions, and indicates a particular lesion, possibly 5-hydroxyuracil to be induced by long-wave UV-B (>300nm). Broadband UV-B produces lesions which seem to be substrates for BER enzyme EndoIV, implicating Nucleotide Incision Repair in their removal, thus preventing accumulation of AP sites due to BER activity in clustered nearby lesions. Uracil-containing cyclobutane pyrimidine dimers appear as the main direct damage and, in the case of UV-B, with a major role in mutagenesis. Uracil DNA glycosylase-deficient strains gave rise to the highest Rifampicin mutation frequencies. Comparing $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ mutagenesis profile, there is a similarity between long-wave UV-B and UV-C. A specific increment in the number of Lac^+ revertants in a T $\rightarrow$ A transversion responsive strain upon treatment with long-wave UV-B implies in the occurrence of Fapy-Adenine as one monomeric damage.

Sumário

1.0 Introdução	1
1.1 A radiação ultravioleta	1
1.2 A absorção do UV por biomoléculas	3
1.3 lesões causadas pela radiação UV	3
1.4 Mutações causadas pela radiação UV	10
1.5 Câncer	14
1.5.1 Epidemiologia	19
1.6 Fototerapia	20
2.0 As lesões induzidas por UV e seu reparo	21
2.1 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	21
2.1.1 A proteína uvrA	22
2.1.2 A proteína uvrB	23
2.1.3 A proteína uvrC	23
2.1.4 Mecanismo geral de NER	23
2.2 Reparo por excisão de bases (BER)	26
2.2.1 DNA glicosilases	26
2.2.2 AP endonucleases	29
2.3 Fotorreativação enzimática	32
2.3.1 Mecanismo da fotorreativação enzimática	32
3.0 Objetivo	34
4.0 Material e métodos	35
4.1 Cepas bacterianas	36
4.2 Meios de cultura e soluções tampão	37
4.3 Manutenção das cepas bacterianas	39
4.3.1 Obtenção das culturas bacterianas para os experimentos	39
4.4 Obtenção do fago P1 carreando o gene de interesse	39
4.4.1 Titulação do fago P1	40
4.5 Obtenção de novas cepas	40
4.6 Sobrevivência bacteriana	41
4.6.1 Fotorrestauração	41
4.7 Mutagênese	42
4.7.1 Mutagênese de seleção em meio contendo Rifampicina ($\text{Rif}^S \rightarrow \text{Rif}^R$)	42

4.7.2 Mutagênese de reversão para crescimento em meio contendo Lactose (Lac ⁺ →Lac ⁻)-----	42
4.8 Especificações das lâmpadas-----	43
5.0 Resultados-----	44
5.1 Sobrevivência bacteriana ao UV-----	45
5.2 Mutagênese Rif ^S →Rif ^R induzida pelo UV-----	59
5.3 Mutagenese Lac ⁻ →Lac ⁺ induzida pelo UV-----	61
6.0 Discussão-----	66
7.0 Conclusão-----	74
8.0 Considerações finais-----	75
9.0 Perspectivas-----	77
10.0 Referências bibliográficas-----	78

1.0 Introdução

1.1 A radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético é subdividida em três bandas denominadas UV-A, UV-B e UV-C. Normalmente, em fotobiologia, a região do UV-A compreende os comprimentos de onda de 400 a 320 nm, o UV-B de 320 a 290 nm e o UV-C de 290 a 200 nm (DIFFEY, 1991). O espectro da radiação UV bem como algumas de suas características encontram-se na figura 1 (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

A proporção das radiações solares que chegam à Terra é de, aproximadamente, 0,3% de UV-B; 5,1% de UV-A; 62,7% de luz visível e 31,9% de infravermelho (PERDIZ *et al.*, 2000). O fluxo espectral de UV na superfície da Terra é modificado por fatores geográficos, como por exemplo, a latitude, a altitude e a reflexão, fatores meteorológicos, de acordo com a presença de nuvens e fatores sazonais, como o horário e as estações do ano (DIFFEY, 1991). Além disso, a composição dos comprimentos de onda que chegam à superfície terrestre depende da composição dos gases que envolvem o planeta, que têm a capacidade de absorver determinadas faixas do espectro solar (JACOVIDES *et al.*, 2009). O UV-C é totalmente absorvido pelo oxigênio estratosférico (O_2) que, ao se dissociar, forma o gás ozônio (O_3). Este, por sua vez, absorve na faixa de 280-320 nm, portanto, grande parte do UV-B também não chega à superfície terrestre. Já o UV-A tem alta eficiência de penetração através das várias camadas atmosféricas, perfazendo 95% do UV terrestre, contra apenas 5% do UV-B (BERSARATINA *et al.*, 2008).

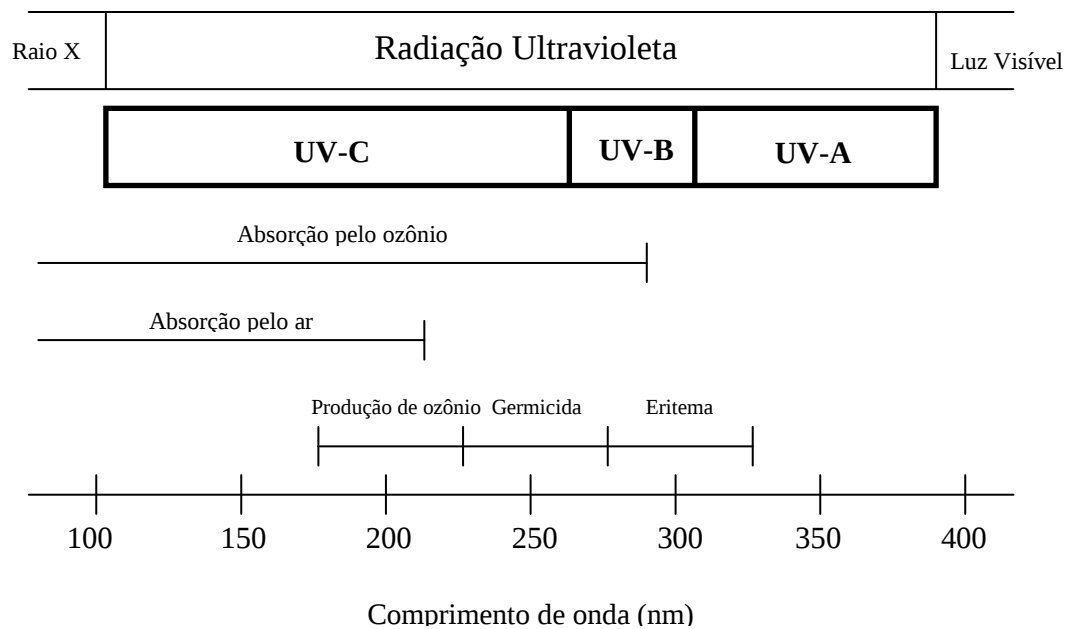


Figura 1: Espectro da radiação ultravioleta.
(Adaptado de FRIEDGERG *et al.*, 2006).

1.2 A absorção do UV por biomoléculas

Os efeitos biológicos da radiação UV são resultantes da absorção fotoquímica das moléculas de significado biológico, das quais o ácido desoxirribonucléico (DNA) é o principal representante, seguido das proteínas e outras moléculas como, por exemplo, os esteróides e as porfirinas. No DNA, as bases nitrogenadas são as responsáveis pela absorção do UV (cromóforos) e cada base possui um espectro de absorção particular, que varia de 260 a 265 nm, já as proteínas têm um pico de absorção em 280 nm (DIFFEY, 1991).

Devido à sua baixa capacidade de penetração nos tecidos, os efeitos observáveis do UV no homem, devido à exposição solar, se limitam à pele e aos olhos. A penetração do UV na pele é menor do que 1 mm, e no olho é absorvido pela córnea e lente, antes de alcançar a retina (DIFFEY, 1991).

1.3 Lesões causadas pela radiação ultravioleta

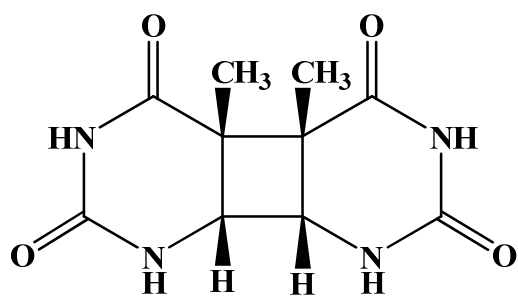
Apesar da baixa incidência do UV-B solar na superfície terrestre, é a essa região do espectro que estão associadas a maior parte das neoplasias cutâneas, enquanto que, estima-se que o UV-A contribua apenas com cerca de 10-20% dos casos de fotocarcinogênese. A carcinogênese associada ao UV-B é descrita como a habilidade dessa faixa de comprimento de onda de induzir lesões pré-mutagênicas no DNA, como os dímeros de pirimidinas ciclobutano (CPD) e o fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PP) (BERSARATINA *et al.*, 2008). Em relação ao UV-A, acredita-se que a indução de mutações ocorra via reações de fotossensibilização por outros cromóforos produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) que atacam o DNA. Isso leva à geração de lesões oxidativas, destacando-se a 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxoGua) (ROSEN *et al.*, 1996).

As lesões no DNA são as mais importantes em termos biológicos, pois podem comprometer processos vitais como a replicação celular e transcrição. Quando o DNA é exposto à radiação UV, as pirimidinas adjacentes tornam-se covalentemente ligadas, resultando numa estrutura em forma de anel, essa estrutura é produto da saturação das duplas ligações entre os carbonos 5,6 (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Dentre as lesões produzidas pela radiação UV, o CPD foi a primeira a ser descoberta (BEUKERS *et al.*, 2008). O CPD pode ter doze formas isoméricas, no entanto, somente o dímero *cis-syn* é predominante (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

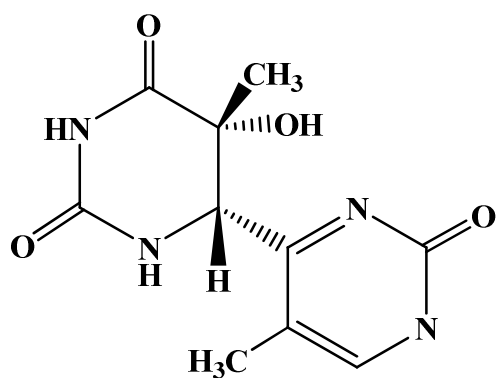
Além dos dímeros de pirimidina outras lesões são produzidas pela radiação UV em pirimidinas, como o fotoproduto 6-4 (6-4PP), o hidrato de citosina e os glicóis de timina (GOOSEN & MOOLENAR, 2008). O 6-4 PP é formado, preferencialmente, em sequências 5'-TC e 5'-CC, e é produzido em níveis menores do que o CPD (PFEIFER *et al.*, 2005). Esse fotoproduto é formado a partir da ligação do C6 de uma pirimidina com o C4 de uma pirimidina adjacente. Esse tipo de lesão gera distorção no DNA bastante proeminente devido à forte angulação criada entre as bases ligadas (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

O 6-4 PP pode dar origem ainda a um outro fotoproduto, o isômero de Dewar, que é produzido quando o 6-4PP, formado pelo UV mais curto, é irradiado com comprimentos de onda próximos a 320 nm. Esse fotoproduto é um isômero de valência do 6-4 PP e sua formação está associada à exposição ao espectro policromático do UV solar ou durante a irradiação utilizando um simulador solar (SSL). Tal fato ocorre pois ambas as fontes emitem radiação em comprimentos de onda tanto na faixa de produção do 6-4 PP, quanto na região de absorção do mesmo em 320 nm, possibilitando a formação do isômero (TAYLOR e colaboradores (1990) *apud* PERDIZ *et al.*, 2000). Na

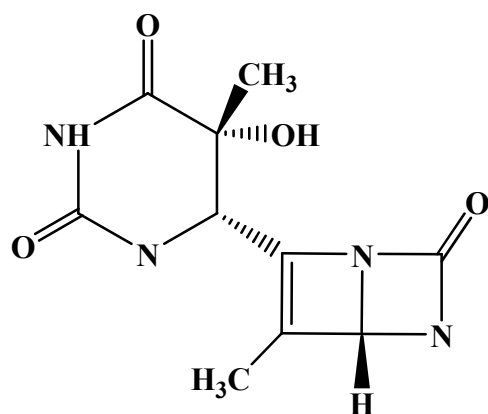
figura 2 estão ilustradas as principais lesões diméricas associadas à radiação UV, enquanto na figura 3 estão as principais lesões do tipo monomérico.



(A)

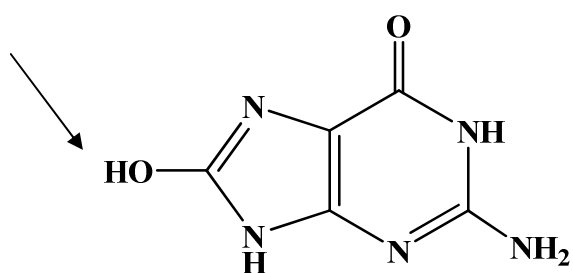


(B)

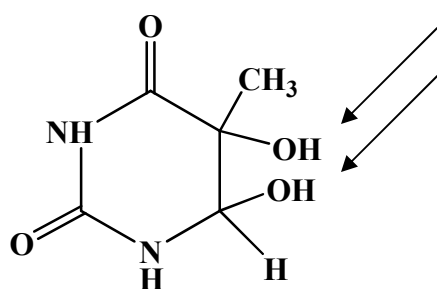


(C)

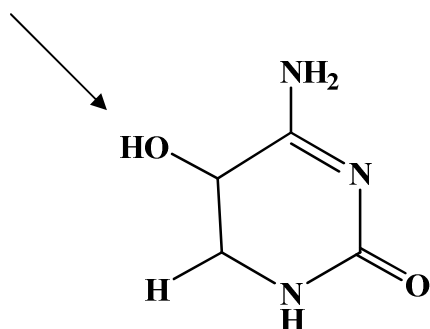
Figura 2: Estruturas químicas das principais lesões geradas pela radiação UV. (A) Dímero de pirimidinas ciclobutano; (B) Fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona; (C) Isômero de Dewar.
(adaptado de FRIEDBERG *et al.*, 2006).



(A)



(B)



(C)

Figura 3: Estruturas químicas de algumas bases alteradas por oxidação. (A) 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8oxoGua); (B) Glicol de timina; (C) 5-hidroxicitosina. (Adaptado de DIZDAROGLU, 2003).

A produção de dímeros no DNA é influenciada pela proporção da composição das bases nitrogenadas no genoma, bem como pela sequência das mesmas. Assim, é possível se obter dímeros, T-T, C-T, C-C e T-C. Na tabela 1 estão relacionadas as proporções de formação dos diferentes tipos de CPD em função do comprimento de onda, em organismos com distintas proporções de bases nitrogenadas (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Observa-se que os dímeros mais produzidos são do tipo T-T, enquanto que os do tipo C-C são formados em menor proporção. Um estudo relativamente recente, demonstrou, do ponto de vista quantitativo, via espectrometria de massas, que sequências TT e TC são mais fotorreativas do que as sequências CT e CC (DOUKI & CADET, 2001).

Além das lesões diméricas, também são associados à radiação UV danos oxidativos produzidos via ERO (ROSEN *et al.*, 1996), que são originadas pela absorção dos fótons por outras moléculas, os cromóforos intermediários (PEAK *et al.*, 1984). Acredita-se que essas moléculas excitadas também possam interagir diretamente com o DNA produzindo lesões (KULUNCSICS *et al.*, 1999). Na tabela 2, estão apresentados os valores encontrados de formação dos principais fotoprodutos produzidos pela radiação UV em células de mamíferos (CHO) (PERDIZ *et al.*, 2000). Pode-se notar que a indução dos três tipos de lesões varia de acordo com a faixa da radiação UV. Quando se observa a eficiência de produção de CPD em cada região espectral, nota-se que o UV-C é o mais eficiente para indução de CPD e 6-4 PP do que o UV-B, todavia, o isômero de Dewar é uma lesão que aparece exclusivamente após exposição ao UV-B.

Tabela 1: Distribuição dos dímeros de pirimidina ciclobutano em DNA irradiado com UV.

Fonte do DNA	Comprimento de onda (nm)	Dose (J/m ²)	Proporção de CPD (%)		
			C<>C	T<>C e C<>T	T<>T
<i>H. influenzae</i> (alta proporção A+T)	265	2 x 10 ²	5	24	71
	280	4 x 10 ³	3	19	78
<i>E. coli</i> (G+C=A+T)	265	2 x 10 ²	7	44	59
	280	4 x 10 ³	6	26	68
<i>M. luteus</i> (alta proporção G+C)	265	2 x 10 ²	26	55	19
	280	4 x 10 ³	23	50	27

(Adaptado de FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Tabela 2: Formação de CPD, 6-4PP e isômero de Dewar no DNA de células expostas ao UV.

	Lesão/kpb/J/m ²			Razão		
	CPD	6-4PP	Isômero de Dewar	6-4PP/CPD	Isômero de Dewar/CPD	Isômero de Dewar/6-4PP
UV-C	2,2 x 10 ⁻²	5,3 x 10 ⁻³	ND	1:4		
UV-B	2,0 x 10 ⁻⁴	2,4 x 10 ⁻⁵	2,9 x 10 ⁻⁶	1:8	1:70	1:8
UV-A	3,0 x 10 ⁻⁷	ND	ND			
SSL	2,1 x 10 ⁻⁶	3,7 x 10 ⁻⁷	1,3 x 10 ⁻⁷	1:6	1:16	1:3

(Adaptado de PERDIZ *et al.*, 2000).

ND: não detectado.

1.4 Mutações induzidas pela radiação UV

As diferentes lesões produzidas pela radiação UV, quando não reparadas, podem comprometer funções biológicas importantes como a transcrição e a replicação do DNA, levando a célula à morte (CHOI *et al.*, 2006). A falha em reparar danos conduz à mutagênese, quando estes estão presentes no DNA durante a replicação. Sabe-se ainda, que, diferentes regiões do espectro têm propriedades mutagênicas distintas. Uma alta frequência de transições em sequências pirimidínicas contendo citosinas é observada após a irradiação com UV-C e UV-B (PFEIFER *et al.*, 2005). No entanto, quando se trata da radiação UV-A, nota-se uma elevada taxa de transversões G→T gerada pelo pareamento incorreto da 8-oxoGua com adenina, ou de transversões A→C causada pela incorporação errônea de 8-oxoGTP pareando com a adenina na fita-molde (KAPPES *et al.*, 2006).

A distribuição e o reparo das lesões causadas no DNA dependem da sequência de nucleotídeos, de estarem ou não em regiões transcritas e da acessibilidade ao DNA pela sua associação com proteínas cromossômicas. A mutagênese gerada por um fotoproduto depende da base nitrogenada afetada, da sequência das bases e da eficiência do seu reparo por um dado mecanismo (TU *et al.*, 1998). Atualmente, já se sabe que a cinética de reparação de cada tipo de lesão pode explicar as diferentes respostas celulares observadas. Em humanos e roedores, cerca de 80-90% dos 6-4 PP são removidos do genoma nas primeiras 4 horas após a irradiação, enquanto que 40-50% dos CPD permanecem no genoma 24 horas após a irradiação. Provavelmente isto se deve à maior afinidade do complexo XPC/hHR23B ao 6-4 PP em relação ao CPD (LIMA-BESSA *et al.*, 2008). Em estudo recente, foi associado a esse dímero um alto potencial mutagênico, visto que 80% das mutações encontradas nos transgenes *Lac* e *cII* de células murinas foram mapeadas em sítios dipirimidínicos. Outro estudo realizado

em camundongos indica, ainda, que após a monomerização do CPD mediada pela enzima fotoliase e luz visível, as mutações induzidas pelo UV-B no gene *TP53* diminuíram cerca de 40-50% (LIMA-BESSA *et al.*, 2008). O papel do 6-4 PP na mutagênese é controverso. Contrariamente ao observado para o CPD, a fotorremissão do fotoproduto 6-4 em fibroblastos humanos não foi capaz de diminuir as mutações em *TP53*. Do mesmo modo, You e colaboradores 2001 (*apud* LIMA-BESSA *et al.*, 2008) apontam pouca ou nenhuma contribuição desse tipo de lesão na indução de mutagênese em células de camundongo.

Em eucariotos, mutações ocorrem durante a replicação celular, quando, perante o bloqueio da replicação por um CPD, há a troca das DNA polimerases replicativas editoriais pela DNA polimerase η (pol η), capaz de fazer síntese translesão sem obstrução da forquilha. Assim, a replicação continua a ocorrer normalmente, mesmo em presença de danos no DNA. No entanto, a polimerase η está envolvida na tolerância ao erro após a irradiação com UV, pois ela é capaz de incorporar duas adeninas opostas ao dímero de timinas, assim, a pol η tem um papel importante na prevenção de uma parte das mutações e morte celular causada pela radiação UV. Em humanos, essa polimerase é codificada pelo gene *POLH*, e em pacientes que apresentam predisposição ao câncer de pele, devido à doença xeroderma pigmentoso (XP), esse gene encontra-se inativo (CHOI *et al.*, 2006).

Em *E. coli*, a DNA polimerase replicativa (pol III) diante de uma obstrução na forquilha devido à uma lesão não instrutiva, um CPD por exemplo, é substituída pela DNA polimerase V capaz de realizar síntese translesão. É associada à síntese translesão uma elevada frequência de mutagênese (WRZESINSKI, *et al.*, 2005).

Se em células de mamíferos o 6-4 PP é rapidamente removido, isso explicaria o resultado da fotorrestauração de 6-4PP não influenciar a mutagênese.

Se o CPD permanece por até 24 horas, a fotorrestauração obviamente influencia a diminuição de mutagênese, pois ao longo de 24 horas deve haver replicações sendo iniciadas. Todavia, se existe pol η , então a mutagênese CPD decorre da atividade pol η sobre dímeros CT, TC e CC.

Outra fonte de mutação bastante estudada é desaminação de citosina, que, apesar de ocorrer espontaneamente devido a variações de pH e temperatura, é aumentada após a irradiação com UV (LEE & PFEIFER, 2003). A perda do grupamento amino da citosina gera uracil, através da substituição do NH_3 por um átomo de oxigênio (Figura 4). O uracil formado é potencialmente mutagênico, pois altera a informação genética gerando uma troca do par $\text{G:C} \rightarrow \text{A:T}$. O uracil produzido no DNA é removido por uma enzima específica chamada uracil-DNA glicosilase (UDG), e organismos deficientes nessa enzima têm altas taxas de mutação espontânea (SHAW & PENG, 1996). Uma fonte bastante comum de geração de uracil é a desaminação de citosinas presentes em dímeros do tipo CPD, em que observou-se que a desaminação é acelerada. Acredita-se que esse tipo de dímero seja o maior contribuinte para as mutações, já que as citosinas dimerizadas desaminam de 7-8 vezes mais rápido em relação aos monômeros, além de possuírem uma meia-vida de até 5 horas. A desaminação de citosinas em regiões de dímeros 5'-CC e 5'-TC, resultam em dímeros contendo 5'-UU e 5'-TU respectivamente, e esse tipo de lesão foi descrita como sendo altamente mutagênica. Em bactérias e outros organismos, existe uma enzima especializada na monomerização de dímeros, denominada fotoliase, contudo, em mamíferos placentários acredita-se que proteína semelhante atue no controle do ciclo circadiano e não na reversão dos dímeros a monômeros, passando a ser chamada de criptocromo. Quando o uracil é formado no DNA, em regiões contendo dímeros, a UDG torna-se incapaz de

remover o uracil formado devido a impedimentos espaciais, restando apenas o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) para remover tais lesões (SOUSA *et al.*, 2007).

Em vertebrados, a citosina contida na sequência 5`CG é alvo de metilação na posição 5 do anel pirimidínico (5^{me}CG). Estudos demonstram que a produção de tumores está associada à desaminação espontânea de 5-metilcitosinas, gerando timina, alterando dessa forma a informação genética produzindo transições do tipo C→T nessas regiões. A desaminação de 5-metilcitosina é aumentada após irradiação com UV-B, o mesmo não ocorre para irradiação com UV-C. Além disso, assim como citosinas, as 5-metilcitosinas podem estar contidas em dímeros CPD, e neste caso a desaminação também é acelerada (ROCHETTE *et al.*, 2009).

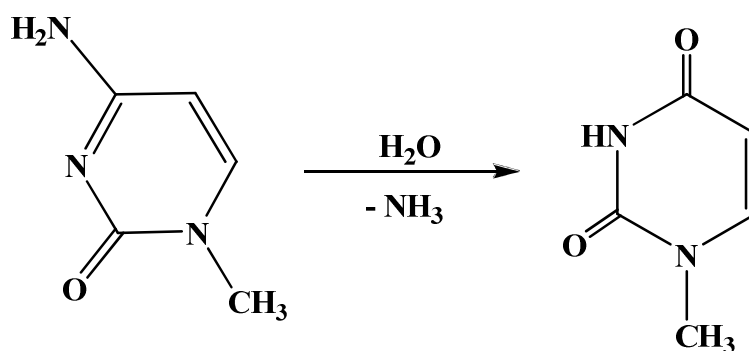


Figura 4: Desaminação de uma citosina gerando a base uracil. (adaptado de PENG & SHAW, 1996).

1.5 Câncer

A radiação UV representa um dos fatores ambientais que mais afeta a saúde humana, graças à sua capacidade de gerar câncer de pele, supressão do sistema imunológico e o envelhecimento prematuro da pele (AUBIN, 2003).

A radiação UV, dependendo do comprimento de onda, pode interagir com tipos celulares distintos localizados em diferentes profundidades (Figura 5). Sabe-se que comprimentos de onda curtos, que correspondem à faixa do UV-B, são predominantemente absorvidos pela epiderme, afetando, portanto, principalmente os queratinócitos, enquanto que comprimentos de onda longos, na faixa do UV-A, penetram em camadas celulares mais profundas, atingindo tanto os queratinócitos, quanto os fibroblastos (BERNEBURG *et al.*, 2000).

Apesar da habilidade de células humanas para remover via mecanismo de excisão de nucleotídeos, os danos causados pela radiação UV, algumas lesões permanecem no genoma. No entanto, existem mecanismos que previnem que tais lesões promovam a mutagênese durante o processo de replicação. Um desses mecanismos é a parada do ciclo celular seguida de reparo, e o outro é a morte celular via apoptose. Em ambos os mecanismos, a proteína p53 tem papel fundamental. O acúmulo de p53 ativada por fosforilação induz a parada do ciclo celular, possibilitando que haja o reparo das lesões antes que a célula entre na fase S. Contudo, caso o dano no DNA não possa ser reparado, vias apoptóticas são ativadas para eliminar as células danificadas. Nesse processo a p53 ativa a expressão de genes de proteínas promotoras da apoptose (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004). Em trabalho anterior Kulms e colaboradores (*apud* KULMS & SCHWARZ, 2002), verificaram a importância das lesões induzidas por UV-B na indução de vias apoptóticas. Foram realizados experimentos em células epiteliais transformadas (HeLa) irradiadas com UV-B, seguida

da adição de lipossomas contendo a enzima fotoliase encapsulada, aumentando assim a reparação dos dímeros através da fotorreativação enzimática. Nesse estudo foi observado que a retirada da lesão era acompanhada de uma inibição da indução de apoptose. Em estudo similar realizado em camundongos e humanos, foi observada a diminuição de queimaduras através da aplicação tópica de lipossomas, contendo a enzima UV endonuclease do fago T4 encapsulada, antes de serem submetidos à irradiação (KULMS & SCWARZ, 2002).

O câncer de pele está intimamente relacionado à exposição solar. Evidências sugerem que os comprimentos de onda abaixo de 320 nm são os mais efetivos na produção desse tipo de câncer e que comprimentos de onda mais longos acentuam os efeitos dos comprimentos de onda curtos (SETLOW, 1974). A carcinogênese gerada pela radiação UV envolve a inativação de um ou mais genes supressores de tumor ou a ativação de pró-oncogenes. A doença também pode resultar de um produto gênico alterado por uma mutação. Vários genes com papel importante na fotocarcinogênese têm sido estudados, dentre eles destacam-se o *TP53*, *TP19* e *RAS*. O gene *TP53* é o alvo mais frequente de alterações genéticas identificadas em cânceres humanos. A perda ou mutação de *TP53* foi demonstrada em aproximadamente 50% dos tumores, embora a frequência de mutação varie em cada tipo. Em câncer de pele não melanoma, foi detectada alta frequência de mutação em *p53* (50-90%), em que as alterações predominantes eram transições de C para T e CC para TT em regiões bipyrimidínicas (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004).

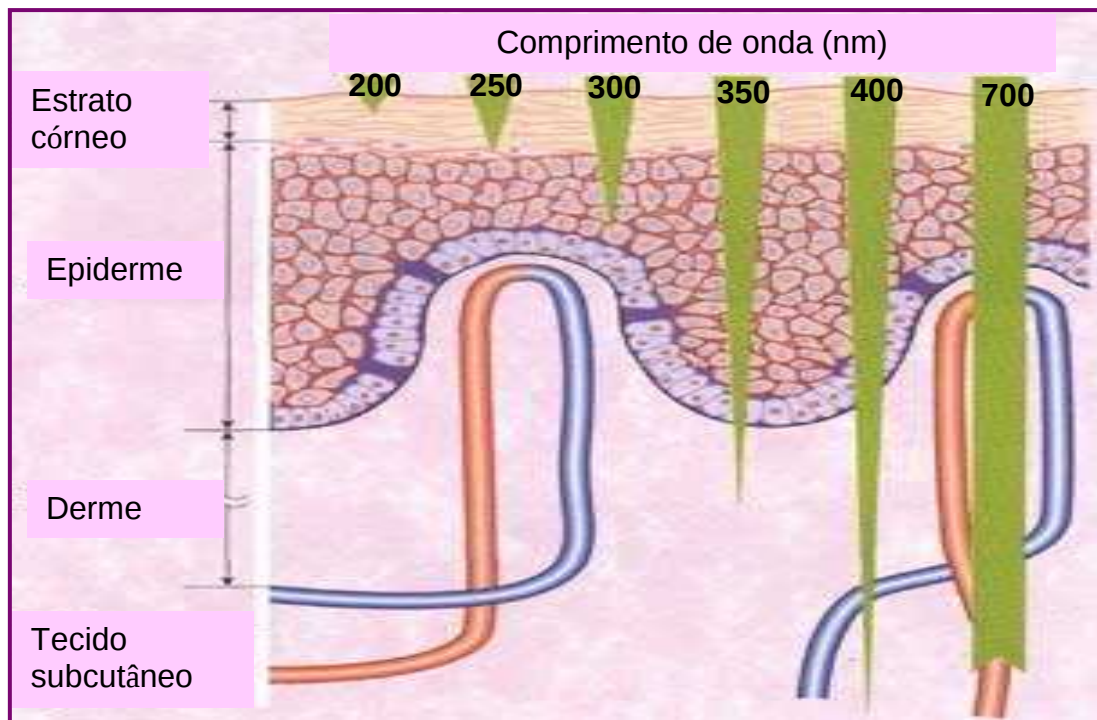


Figura 5: Penetração da radiação UV nas diferentes camadas da pele.

Acredita-se que a indução do câncer de pele pelo UV-B ocorra através de pelo menos dois mecanismos: o efeito direto do UV-B no DNA, causando mutações no genoma, e pelo efeito indireto no sistema imunológico, levando à inabilidade do mesmo em responder contra os antígenos do tumor (AUBIN, 2003). Estudos realizados em camundongos indicam que a exposição ao UV-B introduz lesões no DNA de queratinócitos e células do sistema imunológico, os queratinócitos por sua vez, produzem citocinas que afetam a resposta do sistema imunológico tanto localmente, quanto sistemicamente. No local que recebeu a irradiação, essas citocinas geram um ambiente imunossuprimido, que pode afetar a atividade de células apresentadoras de antígeno (Langerhans). No que se refere à resposta sistêmica, essas citocinas interferem por um período de tempo mais curto, com a indução de respostas mediadas por células do sistema imunológico (ROZA & VINK, 2001). Células do sistema imunológico cutâneas, como as células apresentadoras de antígeno e células dendríticas que contém dano no DNA, tipo CPD, que migram para os linfonodos após a sensibilização, se mostram deficientes na atividade de apresentação de antígeno e estão envolvidas na formação de células T supressoras (ROZA & VINK, 2001).

A indução de dano no DNA tem um papel fundamental na fotoimunologia. A interação do UV com o DNA gera diversos danos, que são substratos para o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). As proteínas desse reparo não estão apenas envolvidas na remoção das lesões causadas pela radiação, mas também têm participação importante na transcrição, possivelmente, envolvendo genes relevantes para a resposta imunológica. Dados na literatura apontam alguns genes XP como subunidades do fator de transcrição basal TFIIH, dando suporte à associação entre danos no DNA e fotoimunologia (KRUTMANN & BERNEBURG, 2000).

Muitas das evidências associando a imunossupressão a danos no DNA se originaram de estudos utilizando a enzima endonuclease V do bacteriófago T4, que é capaz de remover o CPD do DNA deixando um sítio apirimidínico (AP). A aplicação de loções contendo a endonuclease V em pele irradiada com UV reduziu os níveis de interleucina (IL)-10 e fator de necrose tumoral (TNF- α) na epiderme. Ambas as citocinas são imunossupressoras, IL-10 inibe a produção de citocina pelas células T, NK, e macrófagos, bem como a apresentação de antígeno pelos macrófagos. TNF- α estimula a migração das células apresentadoras de antígeno para os linfonodos (YAROSH *et al.*, 2002). Para demonstrar a importância do dano no DNA na resposta imunológica realizou-se um estudo utilizando células apresentadoras de antígeno irradiadas com UV-B e a enzima fotoliase, que é capaz de desfazer exclusivamente a lesão tipo CPD do DNA, através da monomerização do dímero, e foi observado que a remoção de aproximadamente 55% dos CPDs reconstituiu a capacidade das células apresentadoras de antígeno de induzirem sensibilização por contato e produção de células T supressoras (KRUTMANN & BERNEBURG, 2000).

A imunomodulação gerada pela radiação UV é de extrema importância em pacientes que são sensíveis a essa radiação. Vários estudos mostraram que pacientes que sofrem da doença xeroderma pigmentoso, são deficientes em NER e possuem desordens no sistema imunológico. Modelos utilizando ratos transgênicos apontam tanto o reparo global do genoma (GGR), quanto o reparo acoplado à transcrição (TCR) como peças fundamentais na prevenção da imunomodulação causada por UV-B. Em experimentos realizados em camundongos deficientes na atividade XP-A, que não têm o reparo GGR nem TCR, foi demonstrado que estes são altamente susceptíveis à imunossupressão. E em modelos usando animais que possuem apenas o reparo TCR a imunossupressão é aumentada (ROZA & VINK, 2001).

Outra característica da exposição ao UV é o fotoenvelhecimento, que pode ser caracterizado pelo enrugamento, ressecamento, diminuição da espessura da pele e queratose seborréica. Evidências indicam que a indução de metaloproteinases da matriz (MMP) seja o principal fator relacionado à patogênese do fotoenvelhecimento. Em alguns estudos foi verificado que a radiação UV induz ainda modificações pós-transcricionais em proteínas da matriz dérmica, como por exemplo, o colágeno. Em relação às MMP, observou-se que elas têm atividade proteolítica que degradam as proteínas da matriz, e podem ser induzidas tanto pelo UV-B, quanto pelo UV-A. Cada MMP degrada um componente da matriz dérmica, por exemplo, a MMP-1 cliva o colágeno tipo I, II e III, desestruturando, portanto, suas fibras (BERNEBURG *et al.*, 2000). Outro fator que contribui bastante para o fotoenvelhecimento é o declínio da função mitocondrial, que ocorre devido à alta frequência de mutações encontradas no DNA mitocondrial (DNAMt) de células irradiadas. Nesses estudos foram observadas deleções no DNAMt, que foram atribuídas à produção de ERO pela radiação UV (BERNEBURG *et al.*, 2000).

1.5.1 Epidemiologia

A pele é o maior órgão do corpo humano, e é dividida em duas camadas: uma externa, a epiderme e outra interna, a derme. A pele é responsável por proteger o corpo do calor, luz e infecções, além de regular a temperatura do corpo, ser um reservatório de água, vitamina D e gordura.

Embora o câncer de pele seja o tipo de câncer mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, quando detectado precocemente, apresenta altos percentuais de cura. Este tipo de câncer é mais frequente em pessoas com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles que apresentam doenças cutâneas prévias. As neoplasias cutâneas

estão associadas a alguns fatores de risco, como a exposição à radiação ionizante, processo irritativo crônico, genodermatoses (xeroderma pigmentoso), e principalmente à exposição aos raios UV solares (INCA, 2009).

Devido à heterogeneidade da pele, as neoplasias podem acometer diferentes linhagens. Os tipos mais frequentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o carcinoma epidermóide, com 25% dos casos, e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Apesar de o carcinoma basocelular ser o mais frequente, ele também é o menos agressivo (INCA, 2009).

Os cânceres de pele podem ser subdivididos em dois grupos: os não-melanoma e o melanoma.

- Não-melanoma: Fazem parte desse grupo os carcinomas basocelular e o epidermóide. Eles são raramente letais e podem ser retirados cirurgicamente. A cirurgia normalmente é bastante dolorosa e produz cicatrizes. Este tipo de carcinoma é mais frequente em partes do corpo expostas ao sol, como, os olhos, face, pescoço, e braços.
- Melanoma: É o menos prevalente dos cânceres de pele, contudo, está associado a maior letalidade. A sua incidência está associada a fatores genéticos, como doenças e cor da pele, bem como pessoas que têm histórico de queimaduras solares, principalmente durante a infância (OMS, 2009).

1.6 Fototerapia

A fototerapia tornou-se uma das práticas clínicas mais utilizadas no tratamento de desordens cutâneas, como a psoríase, dermatite atópica, vitiligo e *micosis fungóides* (MARTIN *et al.*, 2007). Acredita-se que seu efeito terapêutico ocorra através da inibição da síntese de DNA, no entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se que os efeitos terapêuticos são determinados pelas

propriedades físicas da radiação UV utilizada. O UV-B afeta principalmente a epiderme e a derme, causando depleções de queratinócitos, células de Langerhans e células T. O UV-A, por sua vez, tem a capacidade de penetrar mais profundamente na derme, atingindo fibroblastos, células dendríticas, endoteliais, bem como células que fazem parte do sistema imunológico (MATZ, 2007). Após a irradiação com UV, as células que têm lesões no DNA podem seguir por diferentes vias, dependendo da quantidade de lesões bem como da eficiência de reparo: (1) as células podem reparar as lesões e assumir suas funções normais; (2) podem ser eliminadas via apoptose ou necrose; (3) apesar das lesões no DNA, sobrevivem, no entanto, estão suscetíveis à processos mutagênicos em potencial. Acredita-se que o principal mecanismo responsável no sucesso do tratamento seja a indução de apoptose, principalmente em células do sistema imunológico (KORECK *et al.*, 2007). Contudo, apesar dos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores associados às radiações UV-B e UV-A, alguns efeitos adversos também são descritos (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004).

2.0 As lesões induzidas por UV e seu reparo

O reparo de DNA é um processo em que múltiplas enzimas atuam ordenadamente, removendo lesões, mantendo o genoma livre de danos genéticos, portanto, restaurando sua integridade (FRIEDBERG, 2008).

2.1 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

A descoberta de NER ocorreu através de estudos realizados com culturas de células de *E. coli* irradiadas com UV. Nesses estudos observou-se que as lesões eram retiradas do DNA e que havia ressíntese do fragmento excisado. Os genes individuais que participam do processo foram descobertos posteriormente (VAN HOUTEN *et al.*, 2005).

Os genes NER estão amplamente dispersos pelo cromossomo bacteriano. Os genes *uvrA* e *uvrB* estão sob o controle do sistema SOS, já o gene *uvrC* não está sob seu controle. Vários genes que são relacionados à resposta a danos no DNA são regulados pelo sistema SOS. Esse sistema é bastante importante, já que esses genes são expressos em baixas quantidades constitutivamente. Os níveis da proteína UvrA são de aproximadamente 20-25 moléculas por célula, enquanto, que após a indução SOS o número de moléculas aumenta em 10 vezes; em relação a UvrB os níveis após a indução são de 1000 moléculas contra 250 cópias em nível basal (VAN HOUTEN *et al.*, 2005).

O complexo UvrABC tem um amplo espectro de substratos e se propõe que ele reconheça modificações na conformação espacial do DNA e não necessariamente alterações nas bases. O NER tem um processo chamado de reconhecimento específico da lesão, que é sua habilidade em localizar e identificar a lesão no genoma. Esse reconhecimento é feito através das interações entre as enzimas UvrAB e o DNA lesado (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Atualmente, o modelo proposto do complexo UvrABC, com as três subunidades, só foi mostrado *in vivo* para lesões do tipo CPD (LAGE *et al.*, 2003) e para a mostarda nitrogenada bifuncional HN2 (mecloretoamina) (de ALENCAR *et al.*, 2005).

2.1.1 A proteína UvrA

A proteína UvrA é um polipeptídeo de 940 aminoácidos com cerca de 104 kDa de massa molecular, e faz parte da superfamília de transportadores ABC. A UvrA tem dois motivos dedo de zinco e um motivo hélice-volta-hélice. Este consiste em duas α -hélices com uma pequena cadeia de aminoácidos entre elas. Sua porção C-terminal se ajusta ao sulco maior do DNA, e este tipo de motivo é amplamente encontrado em proteínas que se ligam ao DNA. Acredita-se que a região C-terminal da proteína, que é

rica em glicinas, seja a responsável pelo reconhecimento da lesão. A ligação de UvrA ao DNA é estimulada pela presença de ATP, e sua hidrólise está associada ao desligamento do DNA não lesado (GOOSEN & MOOLENAR, 2008).

2.1.2 A proteína UvrB

A proteína UvrB tem 673 aminoácidos e peso molecular de 76,6 kDa. A proteína purificada aparentemente não possui atividade ATPase, no entanto, acredita-se que esta atividade esteja associada à sua ligação à UvrA ou quando clivada. Em solução, UvrB se dispõe em forma de monômero e interage especificamente com UvrA, formando ligações proteína-proteína e complexos proteína-DNA, sendo o último somente na presença de UvrA (GOOSEN & MOOLENAR, 2008).

2.1.3 A proteína UvrC

A proteína UvrC é um polipeptídeo de 610 aminoácidos e tem peso molecular de 68,5 kDa. A UvrC isolada tem tanto afinidade por UvrA, quanto por UvrB e uma alta afinidade pelo complexo UvrB-DNA (GOOSEN & MOOLENAR, 2008). A UvrC tem dois sítios catalíticos, um na porção N-terminal e o outro na porção C-terminal, que medeiam a incisão do DNA lesado após o reconhecimento por UvrB (VAN HOUTEN *et al.*, 2005).

2.1.4 Mecanismo geral NER

Na figura 6 está representado o esquema proposto com as etapas-chave dos processos de reconhecimento, incisão, síntese e ligação de NER.

Um dímero de UvrA se associa à proteína UvrB, formando o complexo UvrA₂UvrB, cuja interação é estritamente dependente de ATP. UvrB é considerada a proteína chave de reconhecimento de NER bacteriano, uma vez que ela interage com todos os componentes desse mecanismo de reparo (VAN HOUTEN *et al.*, 2005). O complexo UvrA₂UvrB pode distorcer unidirecionalmente pequenos trechos de DNA fita

dupla, deslocando-se sobre ele. A proteína UvrA atua como uma “casamenteira” molecular, que leva a proteína UvrB aos sítios que contém danos no DNA, levando a formação de um complexo temporário UvrA₂UvrB-DNA (HOUTEN *et al.*, 2005). Após a formação desse complexo, ocorre a hidrólise de ATP através da ativação da função ATPase de UvrB. Este é acompanhado pelo desnaturamento local do DNA e por uma mudança conformacional em UvrB (VAN HOUTEN *et al.*, 1993). Estudos realizados com microscopia de força atômica sugerem que a proteína UvrB atue em forma dimérica no DNA, integrando um complexo UvrA₂UvrB₂, que percorreria o DNA em busca de lesões em ambas fitas (VERHOEVEN *et al.*, 2002). Quando a lesão é encontrada pelo complexo UvrA₂UvrB, o DNA é desenrolado e a proteína UvrA se dissocia do complexo, permanecendo apenas a interação UvrB-DNA. A proteína UvrC se liga ao complexo UvrB-DNA e são feitas as duas incisões. Ocorre a hidrólise a 4 ligações fosfodiéster do lado 3`da lesão, e a 8 ligações fosfodiéster do lado 5`da lesão, ambas incisões são realizadas pela enzima UvrC (FRIEDBERG *et al.*, 2006). A DNA helicase II (UvrD) é requerida no complexo pós-incisão para retirar o fragmento de oligonucleotídeo incisado contendo a lesão (ORREN *et al.*, 1992). A proteína UvrB não se desliga da lacuna deixada pelas incisões, protegendo a fita simples de degradações inespecíficas. A UvrB só deixa o complexo após a chegada da DNA polimerase I, que se liga ao terminal 3`OH para realizar a ressíntese do DNA. O último evento do reparo é a ligação do fragmento neo-sintetizado ao pré-existente pela DNA ligase (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Mecanismo geral NER

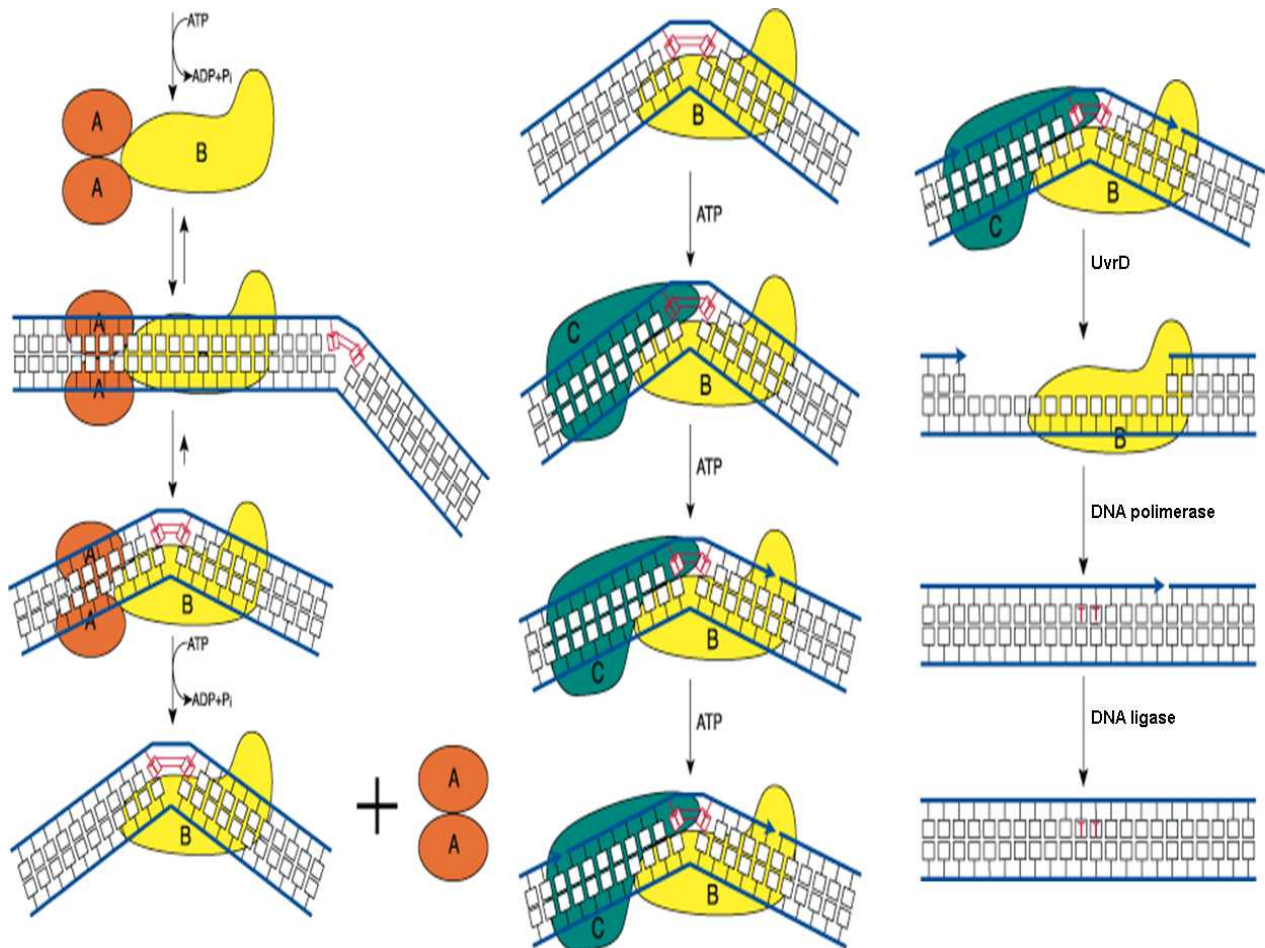


Figura 6: Esquema do mecanismo proposto para o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *E. coli*. (adaptado de RADMAN, 2004).

2.2 Reparo por excisão de bases (BER)

O reparo por excisão de bases é fundamental na reparação de lesões oxidativas, bases modificadas, sítios com perda de bases, quebras simples e pequenas lacunas de DNA (ZHARKOV, 2008). O início da excisão da base modificada ocorre através da hidrólise da ligação glicosídica entre a base e o esqueleto desoxirribose, esta reação é catalisada por uma classe de enzima chamada de DNA glicosilase. Este primeiro evento gera sítios abásicos, que podem ser apurínicos ou apirimidínicos, denominados sítos AP. Os sítos AP também podem resultar da hidrólise espontânea da ligação glicosídica (VISNES *et al.*, 2008). O reparo de sítos AP é realizado por uma segunda classe de enzimas chamadas AP endonucleases, que reconhecem com alta especificidade estas regiões. Estas enzimas fazem incisões no DNA através da hidrólise da ligação fosfodiéster no lado 5' do sítio AP. Algumas AP endonucleases possuem uma atividade AP liase associada, que têm a capacidade de clivar o sítio AP no lado 3'. A hidrólise da ligação fosfodiéster na região 5' do sítio AP gera um resíduo 5'-desoxirribose-fosfato, que é removido por uma outra classe de enzimas, que incluem as exonucleases, bem como enzimas com atividade DNA-desoxirribofosfodiesterase (dRpase). A ação em sequência dessas enzimas gera uma lacuna. O reparo é completado com a inserção do nucleotídeo e sua ligação ao DNA (FRIEDBERG, 2006).

2.2.1 DNA glicosilases

As DNA glicosilases são proteínas pequenas com aproximadamente 30 kDa, e suas atividades podem ser demonstradas observando-se o aparecimento de bases livres após o tratamento com agentes genotóxicos. Estas enzimas são capazes de identificar uma alteração na base e romper a ligação glicosídica entre a base e a desoxirribose, produzindo sítos AP no DNA. A atividade destas enzimas é específica, em que cada uma reconhece alguns tipos de lesões particulares (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

DNA glicosilases estudadas neste trabalho:

- **Uracil-DNA glicosilase (Ung)**

A superfamília das Uracil-DNA glicosilases inclui pelo menos 5 grupos de enzimas reconhecendo substratos similares, apesar da similaridade de sequência entre elas ser baixa. Todas Ung possuem quatro folhas β -pregueadas organizadas paralelamente no centro da proteína, estas estão entre duas α -hélices de cada lado. Estas duas regiões estão conectadas por alças, que fazem parte do sítio ativo da enzima, bem como a região de reconhecimento da lesão que se liga à região dos fosfatos no DNA (ZHARKOV, 2008).

Em *E. coli*, o gene responsável pela codificação desta enzima é o gene *ung*. A proteína Ung é capaz de reconhecer e retirar uracil tanto em DNA fita simples quanto em DNA fita dupla. Além de uracil, Ung também reconhece 5-florouracil, um produto de oxidação, e 5-hidroxiuracil (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Esta enzima é completamente inativa para as outras pirimidinas, tanto quanto para o uracil contido em RNA. A atividade de Ung não gera quebra na fita de DNA após a retirada da base (ZHARKOV, 2008). O funcionamento de Ung não necessita da presença de íons metálicos como cofatores, mas sua atividade pode ser estimulada por Mg^{2+} facilitando sua ligação ao DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

- **Formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg)**

A superfamília das formamidopirimidina DNA glicosilases possui duas enzimas homólogas em *E. coli*, a formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) e a endonuclease VIII (Nei). A estrutura por cristalografia destas enzimas revelou dois domínios conectados por um ligante flexível, em que o domínio N-terminal da enzima é composto por duas folhas β -pregueadas e a porção C-terminal tem dois motivos de ligação ao DNA, uma hélice-volta-hélice e um motivo dedo de zinco (ZHARKOV, 2008).

A função das enzimas Fpg e Nei é o reparo de lesões oxidativas. Em *E. coli* a principal enzima que repara essas lesões é Fpg, que reconhece e excisa lesões do tipo 8-oxoGua e derivados de formamidopirimidinas em guaninas e adeninas. A enzima Nei é específica para reparar pirimidinas oxidadas. A enzima Fpg tem aproximadamente 30,2 kDa e, além de sua atividade DNA glicosilase, ela possui uma atividade AP liase associada. Fpg é capaz de catalisar uma reação de β,δ -eliminação, uma atividade desoxirribofosfodiesterase (dRpase). Fpg consegue liberar a base, clivar a cadeia de DNA, mas após sua atuação é necessário que uma 3`diesterase remova o terminal 3`fosfato, para que o preenchimento da lacuna possa ocorrer (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

- **Endonuclease III (Nth)**

A endonuclease III é uma enzima bifuncional, com uma atividade DNA glicosilase, específica para pirimidinas oxidadas e uma atividade endonuclease via reação de β -eliminação. É uma enzima de aproximadamente 23,4 kDa. Assim como as enzimas Fpg e Nei, Nth também contém dois domínios bem definidos, embora tenham uma organização bem diferente. Nth tem um domínio com seis hélices, que possui um motivo hélice-grampo-hélice, seguido de uma alça rica em resíduos de glicina e prolina e um resíduo bastante conservado de ácido aspártico. O outro domínio contém um núcleo FeS, cuja função é sinalizar o dano oxidativo (ZHARKOV, 2008).

A atividade da Nth gera resíduos de desoxirribonucleosídeos 5`-fosfato 5`terminais e aldeídos α,β insaturados 3`terminais, devido a sua reação de β -eliminação, o terminal deixado precisa de um processamento adicional, para completar o reparo (CUNNINGHAM & WEISS, 1985).

2.2.2 AP endonucleases

As AP endonucleases são menos numerosas em relação às DNA glicosilases. Normalmente, cada organismo possui uma ou duas destas enzimas. Em *E. coli*, são conhecidas duas AP endonucleases, a exonuclease III (Xth) e a endonuclease IV (Nfo) que apesar de possuírem uma similaridade de função, são estruturalmente diferentes (ZHARKOV D. O., 2008). A hidrólise da ligação fosfodiéster da cadeia de DNA, é catalisada por AP endonucleases, que deixam terminais 3'OH e 5'PO₄, para posterior entrada da DNA polimerase (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

- **Exonuclease III (Xth)**

A enzima exonuclease III tem peso molecular de 28 kDa, é estritamente dependente de Mg²⁺ (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Xth é uma exonuclease 3'→5' e, além de sua atividade AP endonuclease, possui atividades 3'fosfatase, 3'fosfodiesterase, e RNase H (ZHARKOV, 2008). A presença de diversas funções catalíticas associadas a uma pequena proteína sugere que um único sítio ativo catalise todas as reações enzimáticas, através de três domínios em sua estrutura. O primeiro é o sítio ativo que catalisa a clivagem das ligações fosfodiéster em uma das hélices do DNA, o segundo reconhece a estrutura em dupla hélice, e o terceiro é responsável pelo reconhecimento da região deixada pela retirada da base, facilitando a função AP endonuclease (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

- **Endonuclease IV (Nfo)**

A endonuclease IV também é uma metaloenzima, dependente de Zn²⁺. Sua função é parecida com a da Xth, no entanto, ela não possui atividade exonuclease (ZHARKOV, 2008). É uma proteína de 32 kDa. Assim como Xth, Nfo ataca o lado 5'fosfodiéster da perda da base, deixando um terminal 3'OH. Adicionalmente, Nfo

remove fosfoglicolaldeído, fosfato, desoxirribose 5`fosfato e resíduos 4-hidroxi-2-pentenal do terminal 3`de DNA dupla fita (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Além da atividade descrita anteriormente para a Nfo, estudos descrevem uma outra atividade para esta enzima, participando do reparo por incisão de nucleotídeos (NIR). Neste reparo, Nfo é capaz de clivar a cadeia de DNA no lado 5' de várias bases alteradas por oxidação, gerando terminais 3'-hidroxil e 5'-fosfato. Foi observado ainda que esta enzima atua fazendo incisões próximas à lesões como por exemplo, 5,6-diidrouracil, 5-hidroxiuracil e resíduos de formamidopirimidina. O terminal 3'-hidroxil deixado pela atuação de Nfo é o substrato necessário para que haja a síntese de DNA pela DNA polimerase I. Por isso, é associado à este mecanismo de reparo baixa toxicidade após as incisões, devido à ausência de intermediários tóxicos, como ocorre no reparo por BER (ISCHENKO & SAPARBAEV, 2002).

Mecanismo geral BER

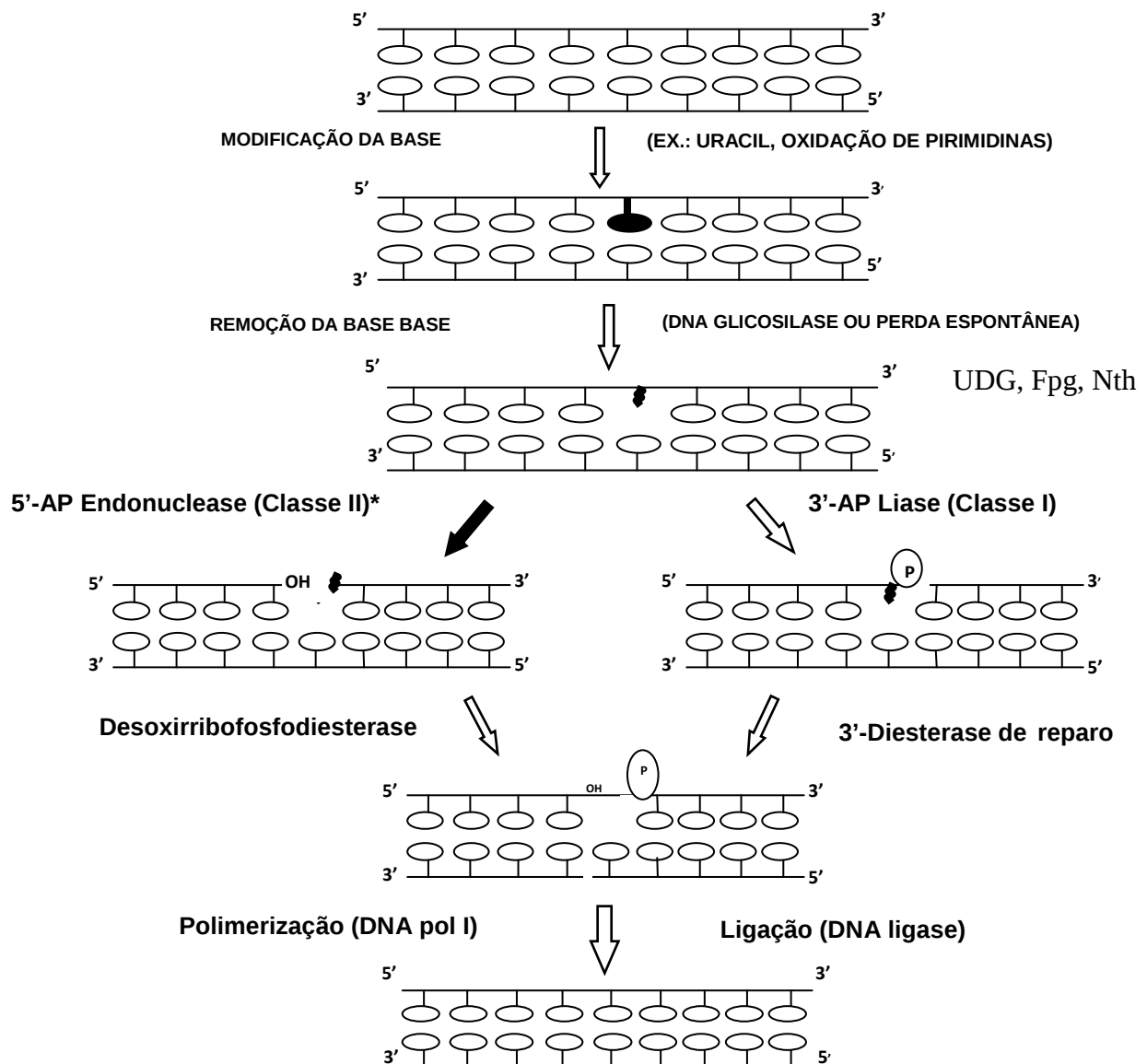


Figura 7: Esquema do mecanismo proposto para o reparo por excisão de bases (BER) em *E.coli*.
(adaptado de LEITÃO *et al.*, 2005).

2.3 Fotorreativação enzimática

Os sistemas de reparo de DNA podem ser subdivididos em dois grupos, de acordo com a sua dependência de luz. O reparo independente de luz, ou reparo no escuro, é observado quando células de *E. coli* após sofrerem irradiação com UV e mantidas no escuro, tornam-se livres de danos no DNA, devido à atuação do NER. Outros mecanismos de reparo que se enquadram nessa categoria são o BER e o reparo recombinacional. Nos mecanismos de reparo dependentes de luz, não há cortes na fita de DNA, ou seja, o DNA permanece íntegro. O mecanismo dependente de luz visível é chamado de fotorreativação enzimática, devido à participação fundamental da enzima fotoliase (BEUKERS *et al.*, 2008).

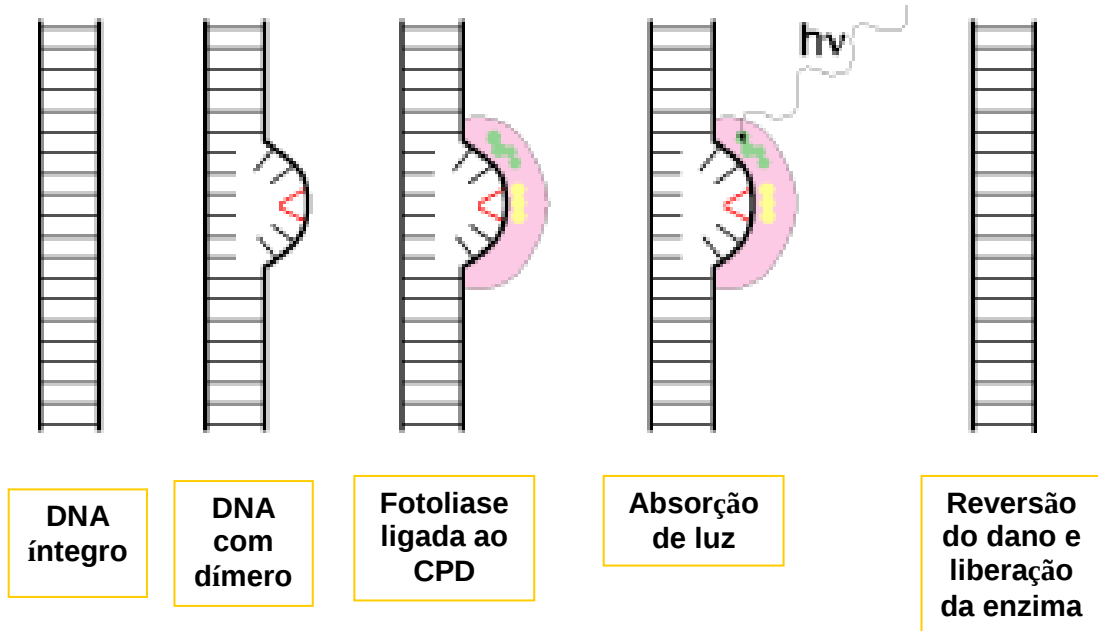
2.3.1 Mecanismo da fotorreativação enzimática

A fotoliase é uma enzima capaz de reverter diretamente o dímero de pirimidinas ciclobutano em monômero, em uma reação dependente de luz na região do visível/UV. A absorção da luz se dá através de cromóforos, os quais não estão covalentemente ligados à proteína. Membros dessa família estão distribuídos por todos os reinos, podem ser subdivididas em três classes de acordo com sua função: CPD fotoliase, 6-4 PP fotoliase e criptocromos (GOOSEN & MOOLENAAR, 2008).

A enzima fotoliase (Phr) de *E. coli* tem 49 kDa e possui dois cromóforos, o FADH e o meteniltetraidrofolato (MTHF). O MTHF é o complexo antena responsável por absorver os fótons de luz na região do visível, e transferi-los para o FADH (GOOSEN & MOOLENAAR, 2008). O FADH, por sua vez, transmite o elétron para a lesão CPD, induzindo a monomerização do dímero. O elétron é doado novamente à enzima, restaurando sua função (MIYAZAWA *et al.*, 2007).

Mecanismo da fotorreação enzimática

(A)



(B)

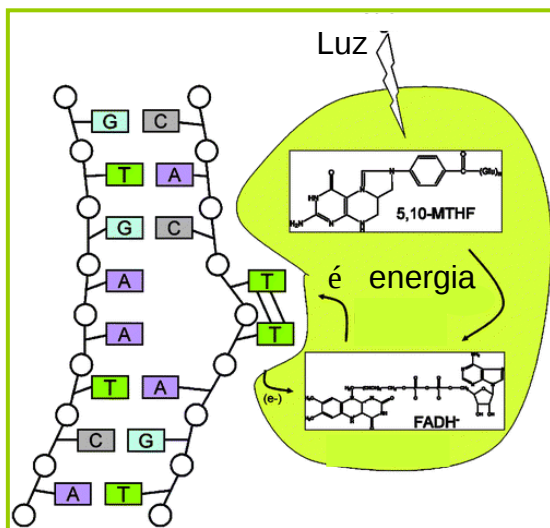


Figura 8: Esquema do mecanismo proposto para a fotorrestauração enzimática (A) e detalhe mostrando a atuação da enzima (B). (adaptado de SANCAR *et al.*, 2004).

A radiação solar é o principal fator etiológico responsável pela alta incidência de câncer de pele. Muitos estudos mostram que ambas as porções de UV que alcançam a superfície terrestre (UV-B e UV-A), interagem com o DNA tanto de forma direta quanto indiretamente através da fotossensibilização de outros cromóforos (KULUNCISIS *et al*, 1999). A identificação dos produtos da radiação é um processo de muito interesse, especialmente o estudo das lesões produzidas pela porção do UV-B. Tal porção do UV compreende uma região de transição entre o UV-C e o UV-A, podendo gerar um grande espectro de lesões. Além disso, graças à atenuação da camada de ozônio, a penetração da porção curta do UV-B na superfície terrestre poderá contribuir para o aumento dos casos de câncer de pele.

3.0 Objetivo

Geral

- Estudar os efeitos letais e mutagênicos induzidos pela radiação UV-B em *E. coli*, utilizando a radiação UV-C como controle.

Específicos

- Avaliar os mecanismos de reparo DNA relevantes para o reparo das lesões causadas pelas regiões do espectro estudadas.
- Apurar a mutagênese gerada pelo UV-B confrontando-a com a do UV-C.

4.0 Material e Métodos

4.1 Cepas bacterianas

Nos experimentos foram utilizadas cepas bacterianas de *Escherichia coli* K12. No quadro abaixo encontram-se relacionadas todas as cepas utilizadas, bem como suas características genéticas relevantes (quadro 1).

Quadro 1: Cepas bacterianas		
DESIGNAÇÃO	GENÓTIPO RELEVANTE	ORIGEM
AB1157	Selvagem	P. Howard-Flanders (University of Yale, USA)
AB1886	<i>uvrA6</i>	de P. Howard-Flanders (University of Yale, USA)
AB1885	<i>uvrB5</i>	de P. Howard-Flanders (University of Yale, USA)
AB1884	<i>uvrC34</i>	de P. Howard-Flanders (University of Yale, USA)
BH20	<i>fpg</i>	S. Boiteux (CEA Fontenay-Aux-Roses, França)
BW527	<i>nfo</i>	B. Weiss (University of Michigan, USA)
BW9091	<i>xthA</i>	B. Weiss (University of Michigan, USA)
BW375	<i>nth</i>	B. Weiss (University of Michigan, USA)
RJF624	<i>uvrA fpg</i>	Este trabalho
RJF631	<i>uvrB fpg</i>	Este trabalho
RJF630	<i>uvrC fpg</i>	Este trabalho
BW544	<i>nfo xthA</i>	B. Weiss (University of Michigan, USA)
BH160	<i>nth fpg</i>	S. Boiteux (CEA Fontenay-Aux-Roses, França)
KY1220	<i>phr</i>	Estoque do laboratório

DESIGNAÇÃO	GENÓTIPO RELEVANTE	ORIGEM
RJF790	<i>Ung</i>	Este trabalho
RJF791	<i>uvrA ung</i>	Este trabalho
RJF792	<i>uvrA ung phr</i>	Este trabalho
RJF793	<i>uvrA phr</i>	Este trabalho
RJF794	<i>phr ung</i>	Este trabalho

DESIGNAÇÃO	SUBSTITUIÇÃO DE BASE	ORIGEM
CC101	AT→CG	J. H. Miller (UCLA)
CC102	GC→AT	J. H. Miller (UCLA)
CC103	GC→CG	J. H. Miller (UCLA)
CC104	GC→TA	J. H. Miller (UCLA)
CC105	AT→TA	J. H. Miller (UCLA)
CC106	AT→GC	J. H. Miller (UCLA)

Os antibióticos utilizados para o cultivo das cepas bacterianas estão relacionados no quadro abaixo (quadro 2).

Quadro 2: Antibióticos utilizados

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO	FORNECEDOR
Estreptomocina	100 µg/ml	Sigma
Ampicilina	100 µg/ml	Kodak International Biotechnologies
Kanamicina	40 µg/ml	Sigma
Cloranfenicol	20 µg/ml	Sigma

4.2 Meios de cultura e soluções tampão

- **Meio LB (*Lysogenic Broth*) (MILLER, 1992)**

NaCl 1% (Indústrias Químicas Merck);

Bacto-triptona 1% (Difco Laboratories);

Extrato de Levedura 0,5% (Difco Laboratories);

Água deionizada (q.s.p.) 1000 ml

- **Meio LB sólido**

Meio LB solidificado com ágar 1,5% (Difco Laboratories).

- **Gelose de superfície (GS) em água deionizada**

NaCl 0,5% (Indústrias Químicas Merck);

Agar 0,6% (Difco Laboratories);

- **Meio MMM (MILLER, 1992), preparar em frascos separados:**

60 ml de Sais MMM-10X

0,3 ml de Tiamina 1% (Calbiochem)

6 ml de Lactose 20% (Indústrias Químicas Merck);

0,24 ml de Casaminoácidos 10% (Difco Laboratories);

0,6 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

Um frasco contendo Agar 1,5% (Difco Laboratories), em um volume de 533 ml de água deionizada

Obs. 1: Para o meio MMM glicose, substituir a lactose por glicose 40% (Indústrias Químicas Merck);

Obs. 2: Excetuando-se a tiamina que deve ser filtrada, autoclavar cada item separadamente, para posteriormente serem misturados.

- **Sais MMM-10X**

K_2HPO_4 10,5% (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

KH_2PO_4 4,5% (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

$(NH_4)_2SO_4$ 1% (Indústrias Químicas Merck);

$Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 0,5% (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

Água deionizada (q.s.p.) 1000 ml

- **Tampão M9 pH 7,0 (MILLER, 1992)**

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,752% (Indústrias Químicas Merck);

KH_2PO_4 0,3% (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

NH_4Cl 0,1% (Indústrias Químicas Merck);

$NaCl$ 0,05% (Indústrias Químicas Merck);

Água deionizada (q.s.p.) 1000 ml

- **Tampão McBis**

$MgSO_4$ 10 mM (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A);

$CaCl_2$ 5 mM (Indústrias Químicas Merck);

Água deionizada (q.s.p.) 100 ml

Após a preparação, os meios e os tampões foram autoclavados por 20 min a 120°C. Após a autoclavagem foram adicionados a cada 100 ml do tampão M9, 100 µl

de MgSO_4 1 mM (Indústrias Químicas Merck) e 100 μl de CaCl_2 0,1 mM (Indústrias Químicas Merck).

4.3 Manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram mantidas em estoques tipo *slants*, que consistem em meio LB suplementado com timina 50 $\mu\text{g/ml}$ e solidificado com ágar 0,75%, mantidos em temperatura ambiente. Para utilização frequente das cepas, as culturas foram mantidas em criotubos contendo a cultura em fase estacionária, em glicerol 87% (Indústrias Químicas Merck) na proporção de 1:1 a -70°C .

4.3.1 Obtenção das culturas bacterianas para os experimentos

As culturas utilizadas nos experimentos foram transferidas com auxílio de micropipetas dos estoques a -70°C para Erlenmeyers contendo meio LB líquido com o antibiótico apropriado (quadro 2). Após o inóculo, as culturas eram crescidas durante a noite a 37°C sob agitação (150 rpm), até alcançarem a fase estacionária (1×10^9 células/ml). Para se obter culturas na fase exponencial de crescimento ($1-2 \times 10^8$ células/ml), foram feitos repiques a partir da cultura em fase estacionária na proporção de 1:40 em meio LB sem antibiótico, a 37°C sob agitação (150 rpm).

4.4 Obtenção de fagos P1 carreando o gene de interesse

Para a obtenção dos fagos P1 carreando o gene de interesse, cresceu-se uma cultura mutada no gene de interesse até a fase exponencial como descrito anteriormente. À cultura foi acrescentado CaCl_2 (2 mM), com o objetivo de tornar a membrana permeável à entrada do fago P1. A multiplicidade de infecção (m.o.i) foi de 1:10, ou seja, um fago para cada 10 bactérias. Posteriormente, uma suspensão de fagos P1 selvagem foi adicionada à cultura (obedecendo a m.o.i) que foi mantida a 37°C sem agitação por 20 minutos, para que houvesse a adsorção. Parte da cultura não foi infectada com o fago e permaneceu guardada a 4°C sem agitação, para posterior

titulação do mesmo. A cultura infectada com o fago foi semeada em placas de LB com o auxílio de GS e incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, as plaques foram raspadas e centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi recolhido e adicionado clorofórmio. A suspensão de fagos foi posteriormente titulada (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.4.1 Titulação do fago P1

A cultura que não foi infectada e mantida a 4°C foi utilizada para se fazer a titulação do fago. O fago foi convenientemente diluído e acrescentado à cultura e incubado a 37°C por 20 minutos sem agitação, para que o fago fosse adsorvido. A semeadura foi realizada em placas de LB com auxílio de GS, e mantidas a 37°C por 24 horas, e posteriormente as plaques foram contadas.

4.5 Obtenção de novas cepas

A técnica utilizada para a obtenção de novas cepas foi a transdução com fagos P1 (MILLER, 1992). Para a realização desta técnica, cresceu-se até a fase estacionária a cultura da cepa recipiente da mutação carregada pelo fago P1, a cultura então foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 min e ressuspensa em 2 ml de Mcbis (MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 5 mM) e em seguida incubada por 30 min a 37°C sem agitação com os fagos de interesse na proporção de 1:10. Os fagos carregam o DNA bacteriano que contém a mutação de interesse associada a um marcador. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 ml de LB contendo 250 µl de citrato de sódio 1 M e incubadas novamente por 1 hora a 37°C sem agitação. Posteriormente, a cultura foi centrifugada e ressuspensa em 1 ml de LB contendo 20 mM de citrato de sódio. Em seguida, as células foram espalhadas em placas de Petri com LB, citrato de sódio 1 M e o antibiótico para a seleção. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e as

colônias foram selecionadas em meio contendo antibiótico apropriado e estocadas a -70°C.

4.6 Sobrevivência bacteriana

Após a obtenção das culturas em fase exponencial de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos entre 4°C e 10°C, e posteriormente ressuspensas no mesmo volume em tampão M9. Antes da irradiação uma alíquota foi retirada para se obter o número inicial de células viáveis. As culturas foram então irradiadas com UV-B (280-320 nm), UV-B (300-320 nm) ou UV-C (254 nm). Para se obter o UV-B (300-320 nm), utilizou-se um filtro de polietileno (NUNC Brand Products), que absorve com bastante eficiência comprimentos de onda inferiores a 300 nm. Após cada dose de UV, alíquotas foram retiradas, apropriadamente diluídas em tampão M9 e semeadas em placas contendo LB sólido. As placas então eram incubadas a 37°C por aproximadamente 24 horas, após esse período as colônias eram contadas, a fração de sobrevivência (N/N_0) era determinada e o resultado plotado em gráfico ($[N/N_0]$ X dose de UV), onde N_0 representa o número inicial de células, e N é o número de células após o tratamento. Os pontos representam a média de três experimentos mais o erro padrão.

4.6.1 Fotorrestauração

Para os experimentos de fotorrestauração as culturas foram crescidas e irradiadas como descrito no item anterior. Após a irradiação com UV-B ou UV-C as placas já semeadas foram expostas à luz visível por 30 minutos para que houvesse a reversão dos dímeros por via enzimática mediada por luz. A determinação da fração celular foi realizada da mesma maneira da sobrevivência celular, e para se obter a taxa de viabilidade após a fotorrestauração, fez-se a razão entre o número de sobreviventes após a fotorrestauração pelo número de sobreviventes sem fotorrestauração.

4.7 Mutagênese

4.7.1 Mutagênese de seleção em meio contendo Rifampicina ($\text{Rif}^S \rightarrow \text{Rif}^R$)

As células foram tratadas como descrito no item anterior, e submetidas à DL_{10} . Uma alíquota foi retirada para se determinar a sobrevivência celular (como descrito anteriormente), e outra foi inoculada em LB líquido e incubada a 37°C sob agitação (150 rpm) por 18-24 horas. No dia seguinte, alíquotas foram retiradas e semeadas em placas de LB contendo rifampicina (100 µg/ml), para se determinar o número de mutantes, e semeadas em meio LB para se determinar o número de células viáveis após a incubação. As placas eram incubadas como descrito no item anterior. O número de mutantes foi calculado fazendo-se a razão entre o número de mutantes encontrado após cada tratamento pelo número de células viáveis e os resultados obtidos foram padronizados e expressos por número de mutantes em 10^8 células (Mut/ 10^8 céls).

Para se saber o número de mutantes após a fotorrestauração, fez-se da seguinte forma: após cada dose de UV uma parte da cultura irradiada ou não (controle) foi exposta (em tampão M9) à radiação visível por 30 minutos. As próximas etapas prosseguiram como as descritas no parágrafo anterior. Os experimentos representam a média de três experimentos mais ou menos o erro padrão.

4.7.2 Mutagênese de reversão para crescimento em meio contendo Lactose

($\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$)

Para a mutagênese de reversão para crescimento em meio contendo Lactose ($\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$) foram utilizadas cepas específicas que são indicadoras de troca de bases. O cultivo e o tratamento das culturas foram iguais aos realizados na mutagênese de aquisição de resistência à rifampicina, salvo os meios de cultura utilizados para obtenção de células viáveis (meio mínimo contendo glicose - MMM glicose) e da mutagênese (meio mínimo contendo lactose - MMM lactose). Para melhor avaliação da

mutagênese, antes da semeadura em MMM lactose, as células eram concentradas 10 vezes. As placas de MMM lactose eram mantidas por 48 horas a 37°C, e as contendo glicose por 24 horas a 37°C. Para o cálculo de incremento de mutantes fez-se a razão do número de mutantes após o tratamento sobre o número de mutantes espontâneos.

4.8 Especificações das lâmpadas

Lâmpada de UV-B: lâmpada ultravioleta com comprimento de onda com pico em 312 nm.

15 W com filtro- modelo VL-215 LM (Vilber Loumart).

Dosímetro: VLX-3W (Vilber Loumart).

Fotocélula: CX-312 (Vilber Loumart).

Lâmpada de UV-C: Germicidal lamp G15T8 15 W (Sankyo Denky).

Dosímetro: VLX-3W (Vilber Loumart).

Fotocélula: CX-254 (Vilber Loumart).

5.0 Resultados

5.1 Sobrevivência bacteriana ao UV

Para investigar o papel do reparo por excisão de nucleotídeos no processamento das lesões induzidas por diferentes porções da radiação UV, foram realizados experimentos de sobrevivência celular utilizando-se cepas deficientes nos principais genes NER, e para o controle foi utilizada uma cepa proficiente em todos os genes desse reparo. Foram determinadas as sobrevivências a doses crescentes de UV-B (com e sem filtro) e para fins comparativos, ao UV-C.

Objetivando estudar as lesões causadas somente pela porção de UV-B que alcança a Terra (> 300 nm), foram conduzidos experimentos usando filtros de polietileno. Esses filtros permitem a passagem apenas de comprimentos de onda superiores a 300 nm. Para o estudo dos efeitos produzidos pelo espectro completo da região do UV-B, os experimentos foram realizados sem a utilização de filtros. Observando-se os gráficos A e B da figura 9, nota-se hipersensibilidade das cepas deficientes em NER, quando comparadas à cepa selvagem. Percebe-se ainda que, para se alcançar uma sensibilidade similar ao UV-B sem filtro, foi necessário um incremento de aproximadamente 5 vezes na dose de UV para os experimentos realizados com UV-B com filtro. Em relação ao UV-C (figura 9 C), assim como para o UV-B nas duas condições testadas, as cepas deficientes nos genes NER se mostraram sensíveis ao tratamento. A dose de UV-C necessária para levar ao mesmo nível de sensibilidade do UV-B sem filtro é cerca de 20 vezes menor e aproximadamente 100 vezes menor quando comparada às doses usadas nos tratamentos com UV-B com filtro. Não foi observada, em nenhum dos três tratamentos testados, diferença de sensibilidade entre os mutantes.

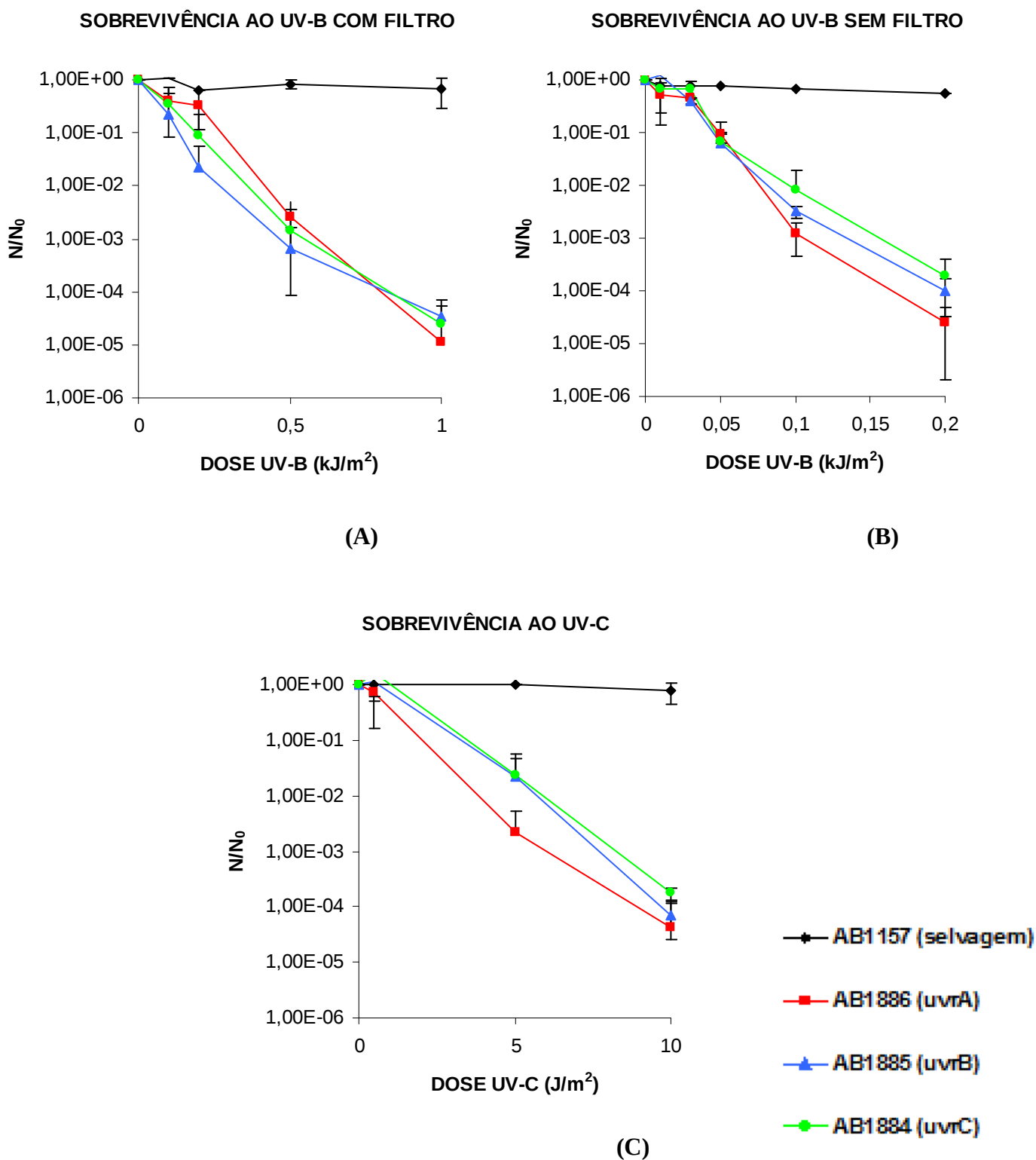


Figura 9: (A) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1157 (selvagem), AB1886 (*uvrA*), AB1885 (*uvrB*) e AB1884 (*uvrC*); (B) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1157 (selvagem), AB1886 (*uvrA*), AB1885 (*uvrB*) e AB1884 (*uvrC*); (C) Sobrevivência ao UV-C das cepas AB1157 (selvagem), AB1886 (*uvrA*), AB1885 (*uvrB*) e AB1884 (*uvrC*);

Além das lesões tipo dímero de pirimidina, classicamente envolvendo o reparo via NER, também são associados à radiação UV danos oxidativos produzidos via espécies reativas de oxigênio (ROSEN *et al.*, 1996), que são originadas pela absorção dos fótons por cromóforos intermediários (PEAK *et al.*, 1984). Acredita-se que, essas moléculas excitadas também possam interagir diretamente com o DNA produzindo lesões (KULUNCSICS *et al.*, 1999). Em trabalho recente realizado em nosso laboratório, foi demonstrado que cepas deficientes no gene *xthA*, são hipersensíveis à radiação UV-B, o que não ocorre para o tratamento com UV-C. A toxicidade observada não foi atribuída ao clássico CPD, uma vez que a sensibilidade foi abolida com o uso de um captador de íons ferro, indicando assim a geração de ERO via reação de Fenton pela radiação UV-B (SOUZA *et al.*, 2006).

Para se avaliar a geração de lesões oxidativas induzidas pelas duas regiões de UV-B estudadas neste trabalho, analisou-se a participação das enzimas do reparo por excisão de bases (BER) na remoção de tais lesões, através de experimentos de sobrevivência celular de cepas deficientes nos quatro principais genes dessa via.

Analisando-se os gráficos da figura 10, observa-se maior sensibilidade aos tratamentos das cepas deficientes nos genes *xthA* e *fpg* desde as primeiras doses, e discreta sensibilidade das cepas deficientes em *nfo* e *nth* para o UV-B com filtro (figura 10 A). O mesmo não ocorre para o UV-B sem filtro, em que se destaca a cepa deficiente no gene *nfo*. As cepas deficientes em *xthA* e *fpg* apresentam sensibilidade intermediária entre as cepas *nfo* e a selvagem. O mutante em *nth* tem um perfil de sobrevivência similar ao da cepa selvagem (figura 10 B). É importante ressaltar que as doses de UV-B utilizadas são cerca de 8 vezes maiores para o UV-B com filtro, e 10 vezes maiores para o UV-B sem filtro em relação às doses utilizadas na sobrevivência das cepas deficientes

em NER. Em relação aos resultados da sobrevivência ao UV-C, não foi observada diferença de sensibilidade entre as cepas mutantes e a cepa selvagem (figura 10 C).

Para melhor analisar a participação de BER na remoção das lesões causadas pelo UV-B e UV-C, foram realizados experimentos de sobrevivência com cepas duplamente deficientes nas duas possíveis rotas de reparo. A cepa BH160 duplo mutante nos genes *fpg* e *nth* tem a capacidade reduzida de fazer incisões entre o açúcar e a base modificada, e a cepa BW544 duplo mutante nos genes *xth* e *nfo* não possui atividade AP endonuclease. De acordo com os gráficos da figura 11, não nota-se uma maior sensibilidade em comparação à cepa selvagem em ambos os tratamentos.

No intuito de se averiguar a possível participação de Fpg na correção das lesões, foram construídas cepas duplamente deficientes nos genes *uvrA/fpg*, *uvrB/fpg* e *uvrC/fpg* e avaliação das suas sobrevivências ao tratamento com UV-B com e sem filtro. De acordo com os gráficos da figura 12, não foi observada diferença de sensibilidade entre as cepas apenas deficientes em NER e as cepas duplo mutantes NER/Fpg.

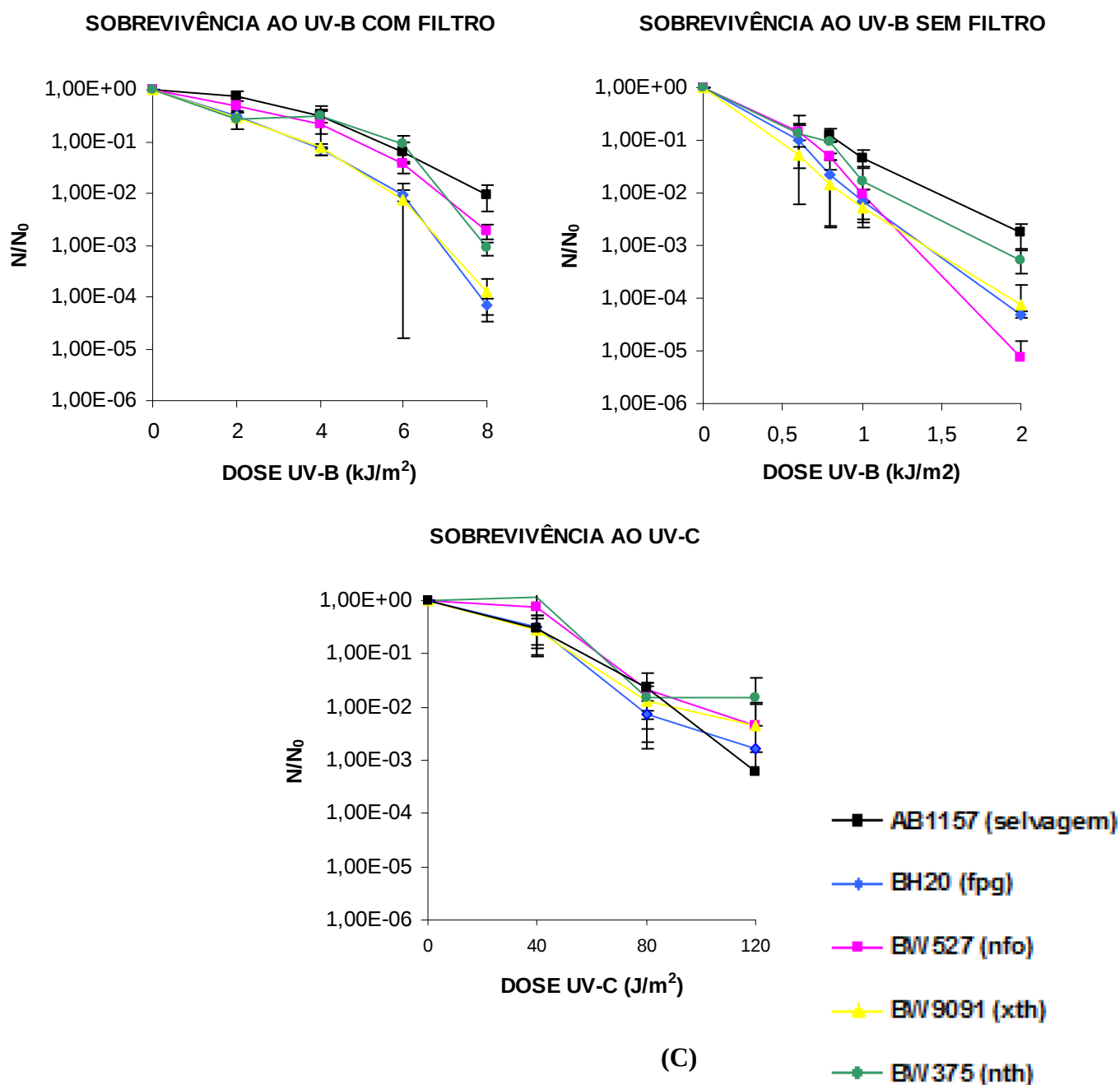


Figura 10: (A) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1157 (selvagem), BH20 (*fpg*), BW527 (*nfo*), BW9091 (*xth*) e BW375(*nth*); (B) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1157 (selvagem), BH20 (*fpg*), BW527 (*nfo*), BW9091 (*xth*) e BW375(*nth*); (C) Sobrevivência ao UV-C das cepas AB1157 (selvagem), BH20 (*fpg*), BW527 (*nfo*), BW9091 (*xth*) e BW375(*nth*)

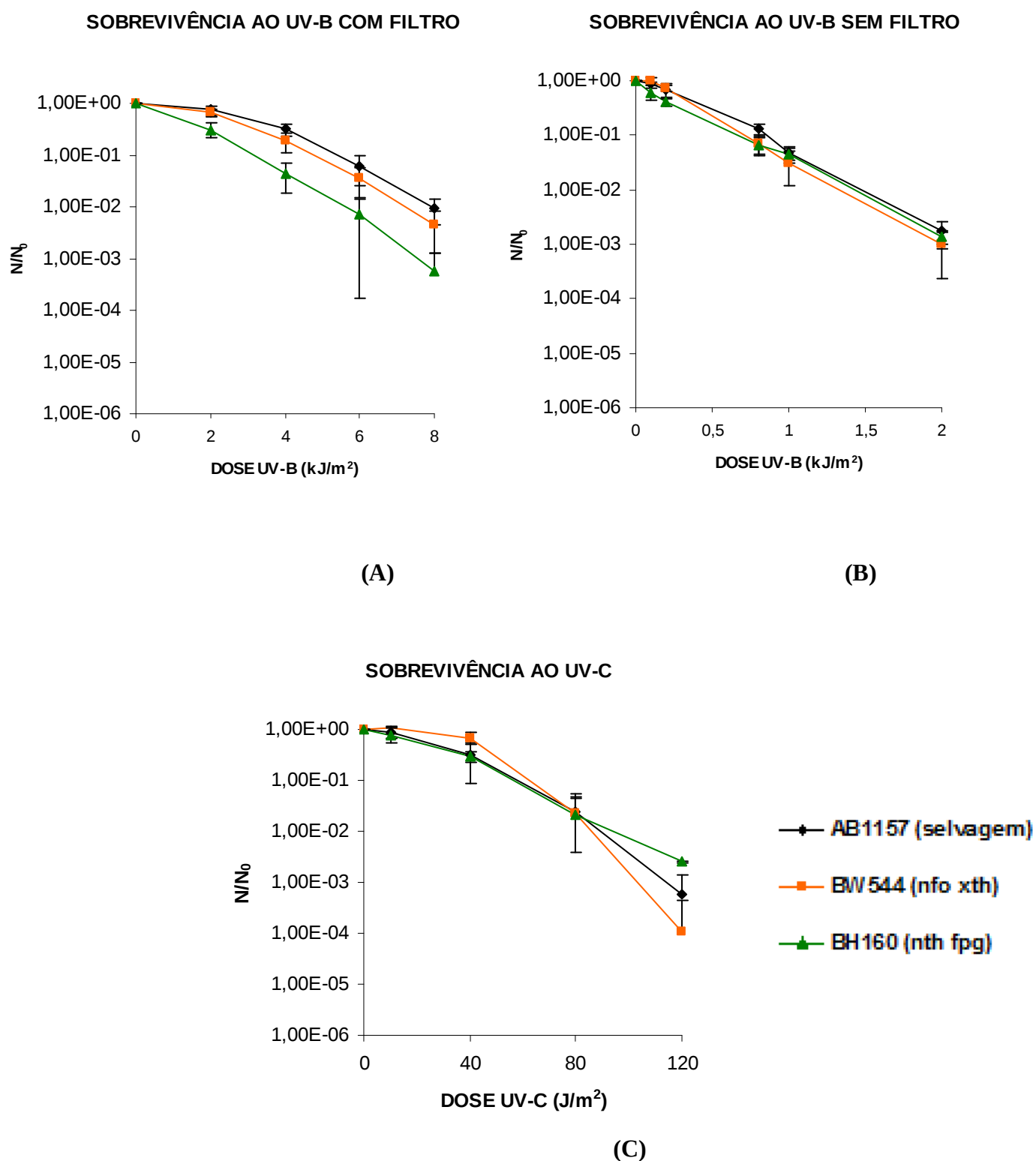


Figura 11: (A) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1157 (selvagem), BW544 (*nfo xth*) e BH160 (*nth fpg*); (B) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1157 (selvagem), BW544 (*nfo xth*) e BH160 (*nth fpg*); (C) Sobrevivência ao UV-C das cepas AB1157 (selvagem), BW544 (*nfo xth*) e BH160 (*nth fpg*).

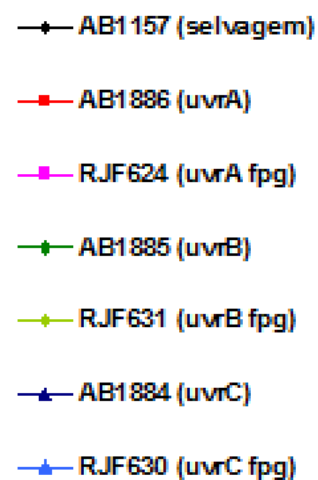
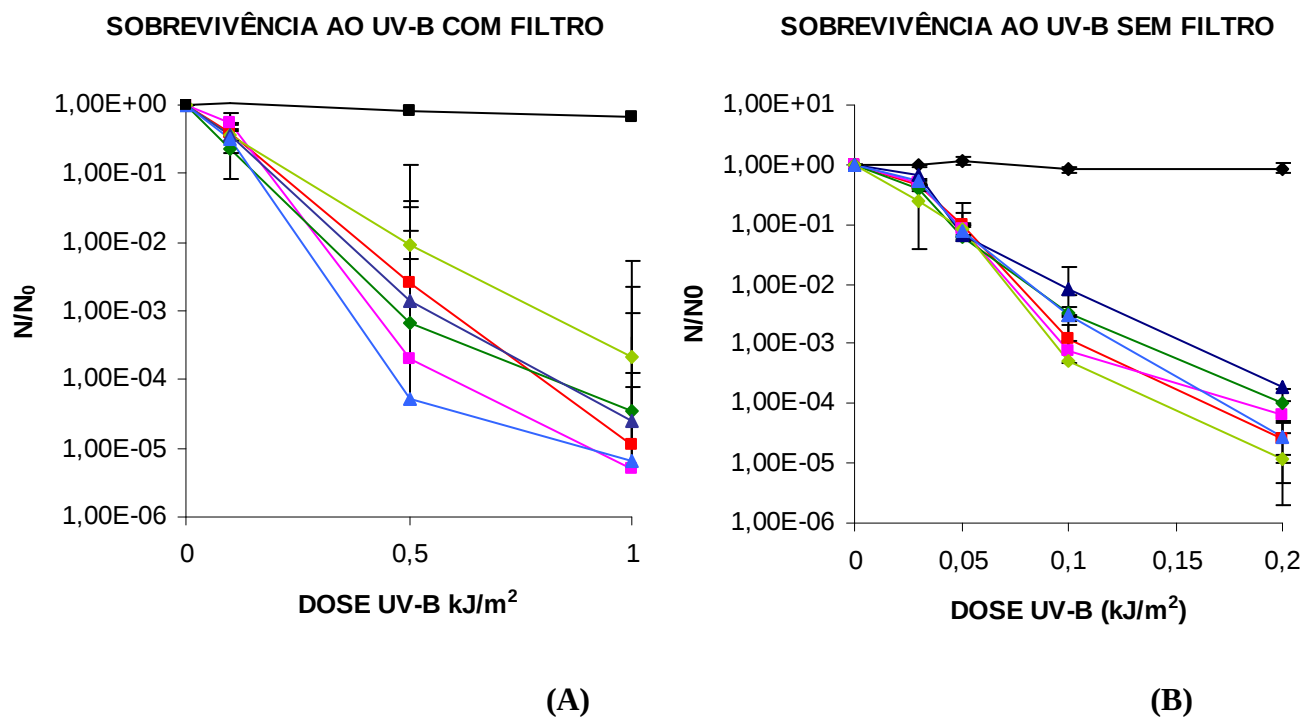


Figura 12: **(A)** Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1157 (selvagem), AB1886 (*uvrA*), RJF624 (*uvrA fpg*), AB1885 (*uvrB*), RJF631 (*uvrB fpg*), AB1884 (*uvrC*) e RJF630 (*uvrC fpg*); **(B)** Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1157 (selvagem), AB1886 (*uvrA*), RJF624 (*uvrA fpg*), AB1885 (*uvrB*), RJF631 (*uvrB fpg*), AB1884 (*uvrC*) e RJF630 (*uvrC fpg*).

A mutagênese causada pelo UV-B é caracterizada por uma alta frequência de transições em sequências bipyrimídicas contendo citosinas. Acredita-se que o fotoproduto tipo CPD seja a lesão mais mutagênica por ser quantitativamente predominante, ter o reparo lento e propensão ao *bypass* (PFEIFER *et al*, 2005). Além disso, relatos na literatura apontam que as citosinas contidas em dímeros são mais sujeitas a desaminação após a irradiação com UV produzindo uracil (PENG *et al*, 1996).

De posse dessas informações, foram construídas cepas deficientes no gene *ung*, que codifica a enzima responsável por remover a base uracil do genoma, em diferentes contextos genéticos. Além da deficiência na uracil DNA glicosilase, com o intuito de garantir que os dímeros permanecessem no genoma, foram construídas cepas deficientes no gene *phr*, que codifica a enzima fotoliase. Ambas as mutações foram introduzidas na cepa selvagem AB1157 e na cepa deficiente em *uvrA* AB1886. A cepa RJF790 deficiente em *ung*, e KY1220 deficiente em *phr* apresentaram um perfil de sensibilidade similar ao da cepa selvagem AB1157. Interessantemente, o duplo mutante *ung/phr* se mostrou mais sensível ao tratamento desde as doses mais baixas (figura 13). Em relação ao duplo mutante *uvrA/ung*, não foi observada diferença de sensibilidade comparada ao simples mutante *uvrA* (figura 13). Resultados semelhantes foram obtidos irradiando-se as mesmas cepas com UV-B sem filtro (figura 14) bem como para a irradiação com UV-C (figura 15).

A fim de se discriminar as lesões do tipo dímero de pirimidina do total de lesões produzidas tanto pelo UV-B com filtro, bem como pelo UV-B sem filtro, experimentos de sobrevivência celular foram conduzidos seguidos de iluminação com luz na região do visível (figuras 17, 18 e 19). Tal estratégia experimental permite que ocorra a fotorrestauração enzimática realizada pela fotoliase. Como controle os experimentos foram realizados também com cepas deficientes na enzima fotoliase. Os resultados

obtidos apontam uma sensibilidade similar para todos os mutantes testados. De acordo com o esperado, somente as cepas proficientes no gene *phr* tiveram sua sobrevivência aumentada após a iluminação com luz visível. A cepa selvagem se mostrou igualmente resistente aos tratamentos com ou sem iluminação com luz visível. O mesmo perfil de sobrevivência foi observado para ambas as regiões do UV-B estudadas. Todas as cepas foram similarmente sensíveis ao tratamento.

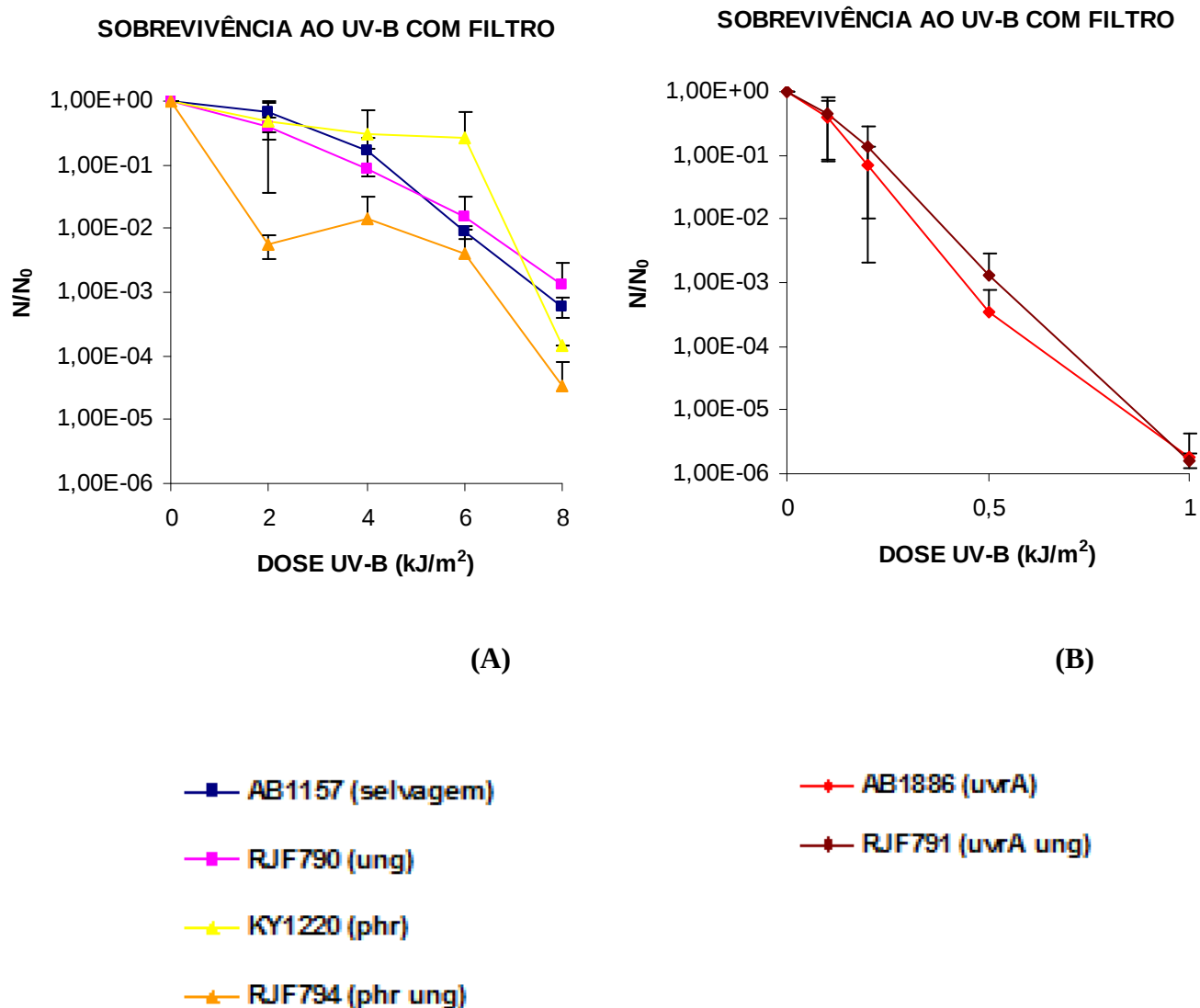


Figura 13: (A) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1157 (selvagem), RJF790 (*ung*), KY1220 (*phr*) e RJF794 (*phr ung*); (B) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*).

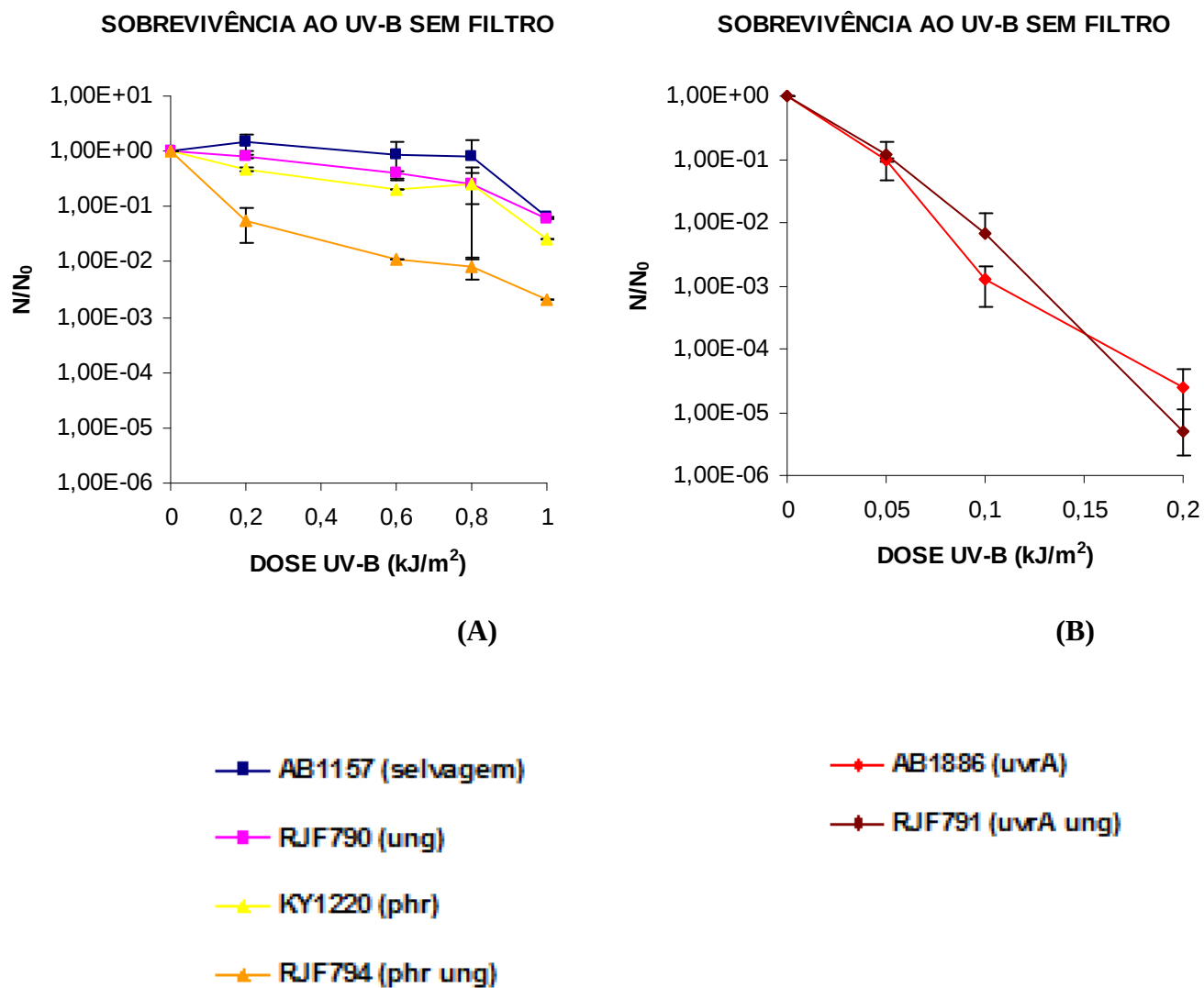


Figura 14: (A) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1157 (selvagem), RJF790 (*ung*), KY1220 (*phr*) e RJF794 (*phr ung*); (B) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*).

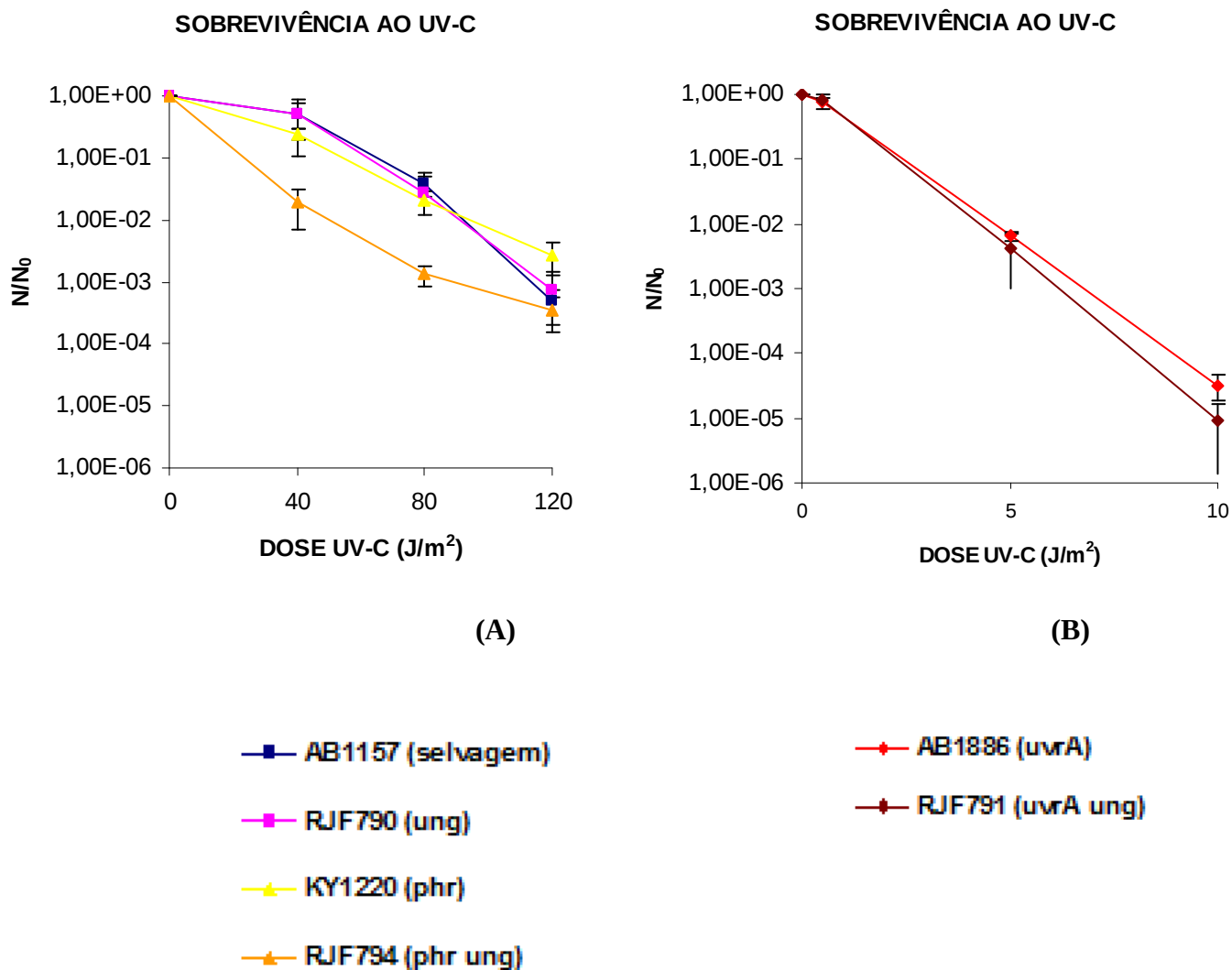


Figura 15: (A) Sobrevivência ao UV-C das cepas AB1157 (selvagem), RJF790 (*ung*), KY1220 (*phr*) e RJF794 (*phr ung*); (B) Sobrevivência ao UV-C AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*).

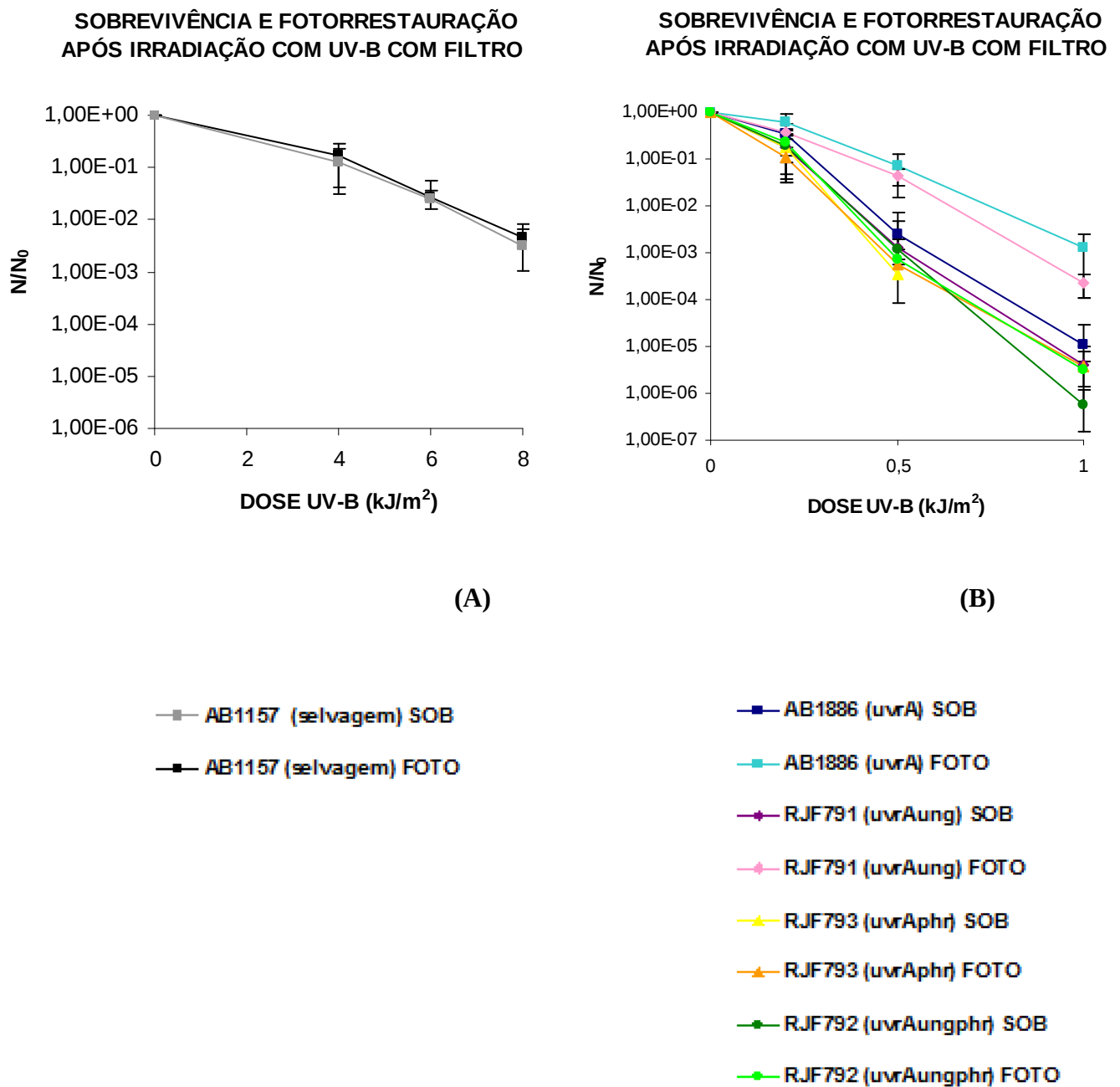


Figura 16: (A) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) da cepa AB1157 (selvagem) com e sem fotorrestauração, (B) Sobrevivência ao UV-B (com filtro) das cepas AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*), RJF793 (*uvrA phr*) e RJF792 (*uvrA ung phr*) com e sem fotorrestauração.

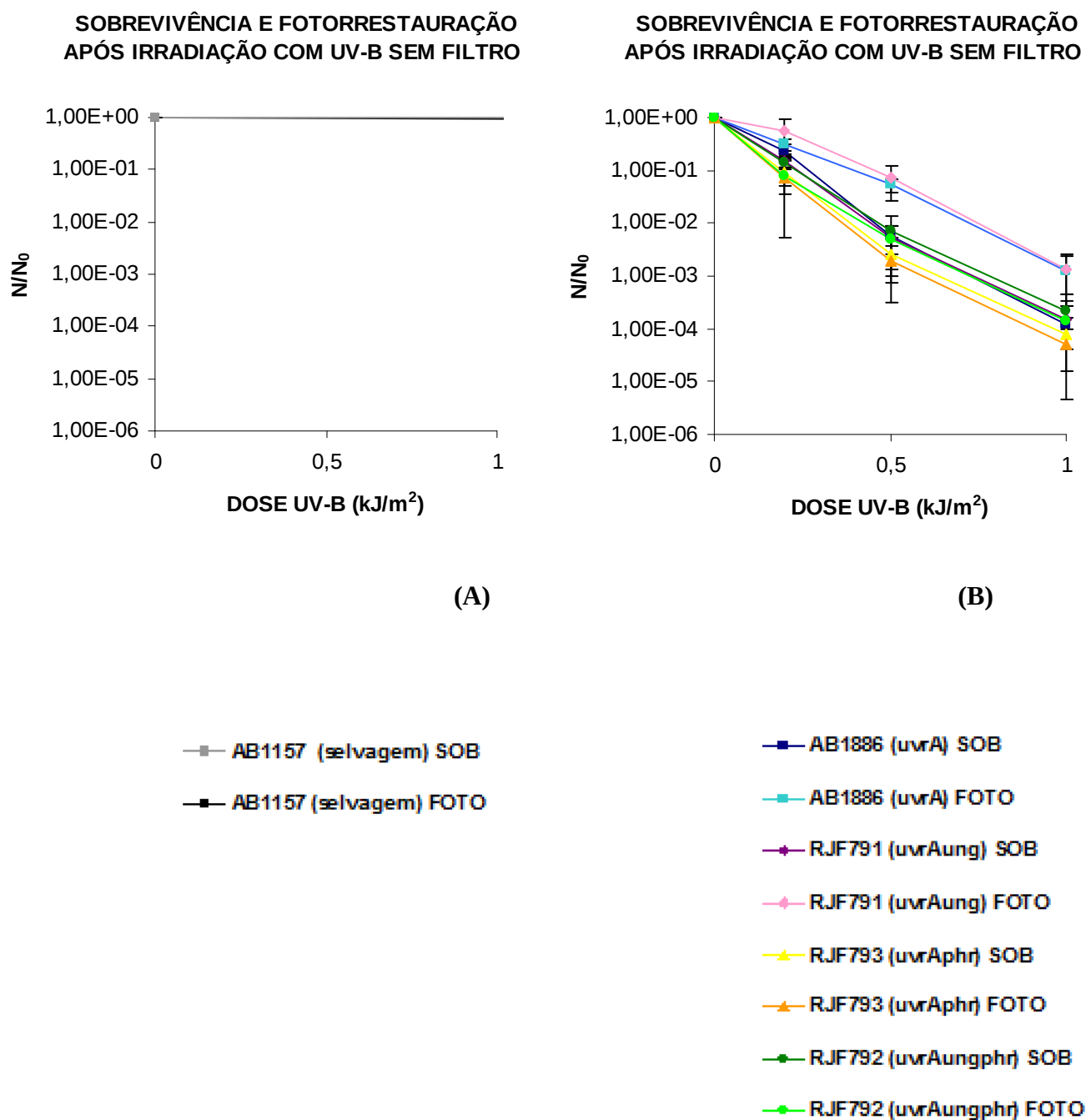


Figura 17: (A) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) da cepa AB1157 (selvagem) com e sem fotorrestauração, (B) Sobrevivência ao UV-B (sem filtro) das cepas AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*), RJF793 (*uvrA phr*) e RJF792 (*uvrA ung phr*) com e sem fotorrestauração.

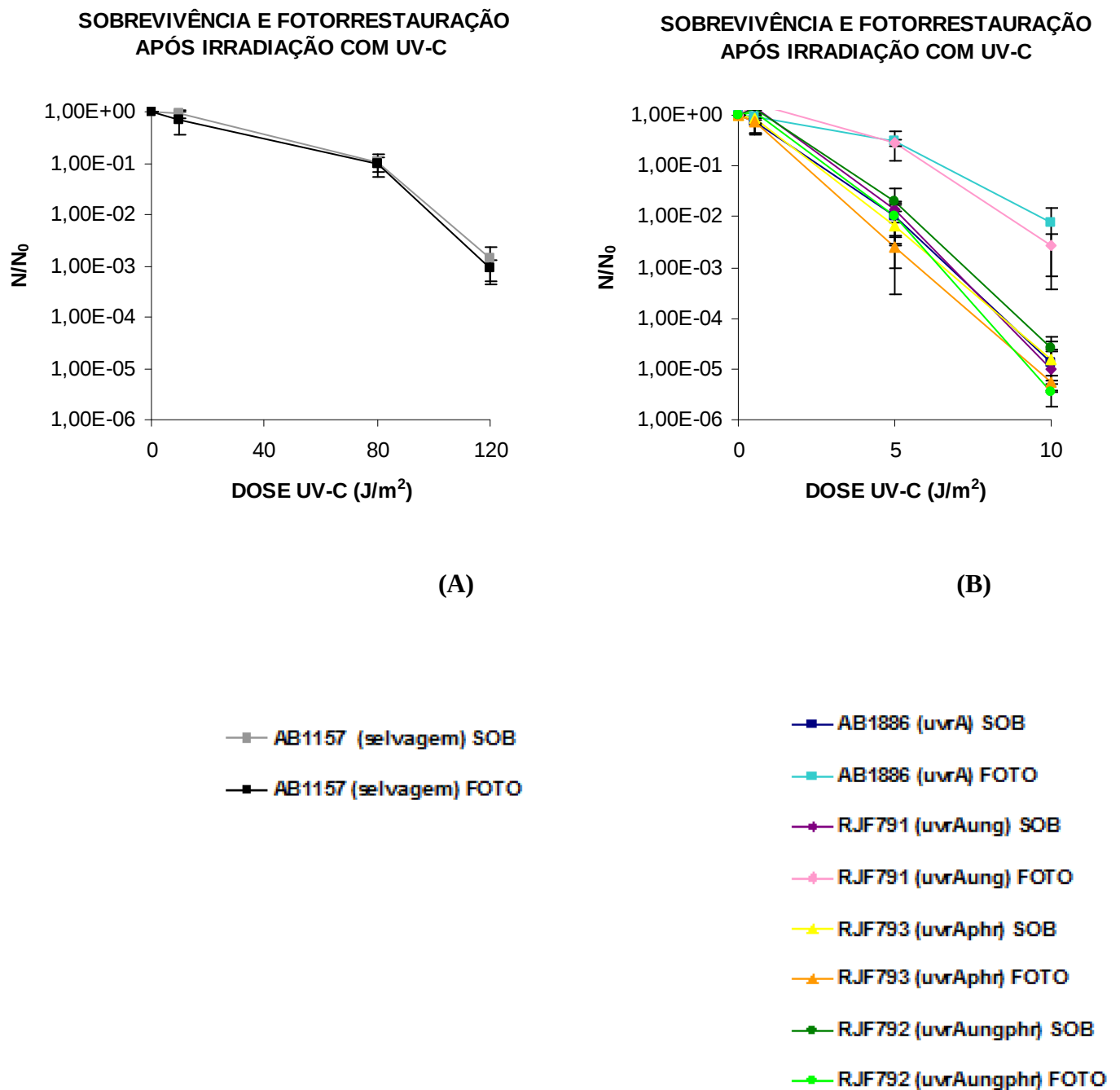


Figura 18: (A) Sobrevivência ao UV-C da cepa AB1157 (selvagem) com e sem fotorrestauração, (B) Sobrevivência ao UV-C das cepas AB1886 (*uvrA*) e RJF791 (*uvrA ung*), RJF793 (*uvrA phr*) e RJF792 (*uvrA ung phr*) com e sem fotorrestauração.

5.2 Mutagênese $\text{Rif}^S \rightarrow \text{Rif}^R$ induzida pelo UV

Vários relatos na literatura apontam lesões em citosinas como sendo os principais danos produzidos pelo UV-B, tais lesões se traduzem em mutações do tipo transição $C \rightarrow T$ ou em “tandem” $CC \rightarrow TT$, que são as assinaturas deixadas pela ação do UV-B no DNA (PENG *et al*, 1996; PFEIFER *et al*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007). De acordo com nossos resultados de sobrevivência celular, a ausência da uracil DNA glicosilase não sensibiliza nenhuma das cepas testadas. Para se avaliar um possível papel de lesões em citosinas gerando uracil no incremento da mutagênese em cepas deficientes em *ung*, foram realizados experimentos para verificar a capacidade de crescimento em meio de cultura contendo rifampicina após a irradiação ($\text{Rif}^S \rightarrow \text{Rif}^R$). Para garantir que as lesões produzidas não fossem removidas do genoma, os experimentos de mutagênese foram realizados utilizando-se cepas deficientes no gene *uvrA*. Analisando os resultados obtidos, nota-se que tanto para o UV-B com filtro como para o UV-C, as cepas que não têm atividade UDG apresentam maior frequência de mutagênese quando comparadas às cepas proficientes nessa enzima. Além disso, estes resultados apontam uma grande contribuição dos dímeros de pirimidina na mutagênese induzida por ambas as lâmpadas. Tais resultados podem ser observados analisando-se a diminuição na taxa de mutagênese após a fotorrestauração (figura 19).

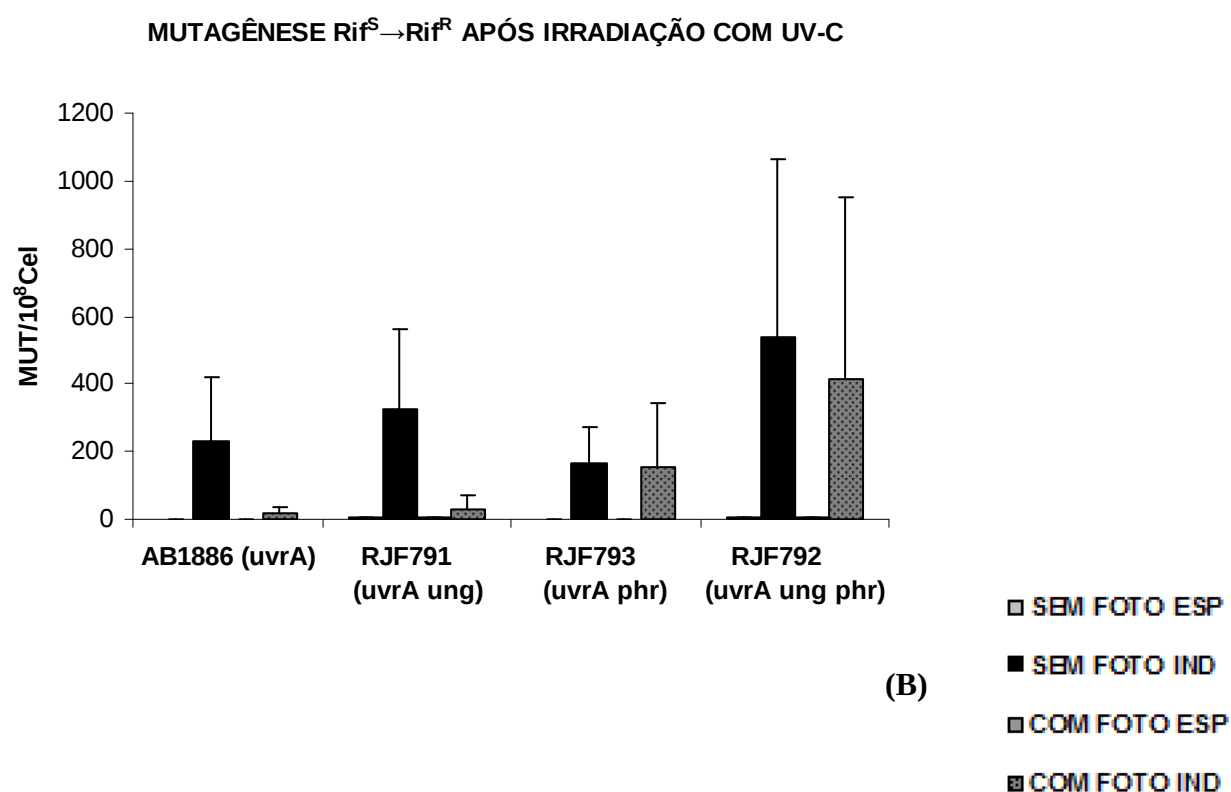
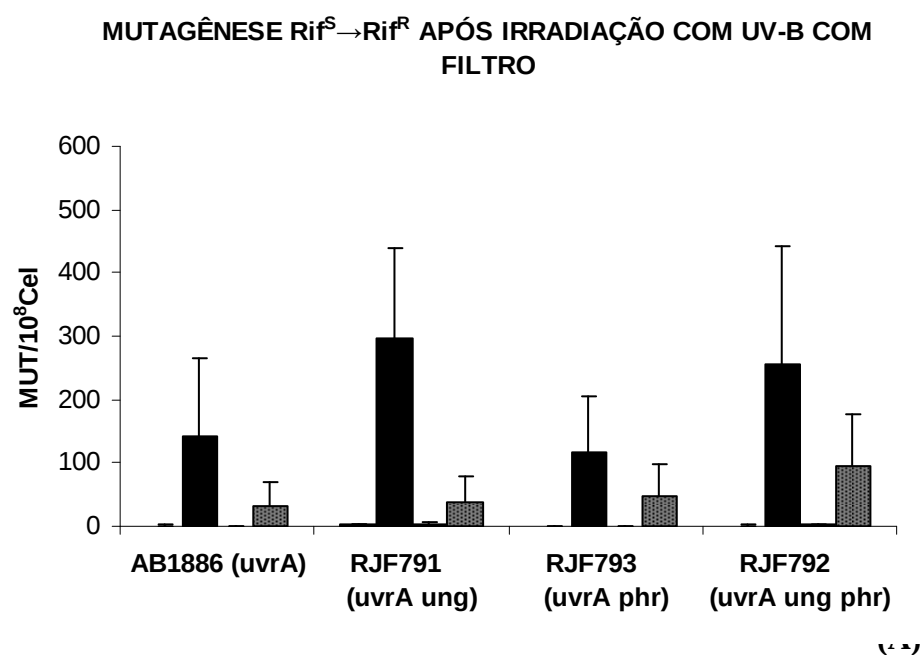


Figura 19: (A) Mutagênese $Rif^S \rightarrow Rif^R$ das cepas AB1886 (*uvrA*), RJF791 (*uvrA ung*), RJF793 (*uvrA phr*) e RJF792 (*uvrA ung phr*) após irradiação com UV-B com filtro; (B) Mutagênese $Rif^S \rightarrow Rif^R$ das cepas AB1886 (*uvrA*), RJF791 (*uvrA ung*), RJF793 (*uvrA phr*) e RJF792 (*uvrA ung phr*) após irradiação com UV-C.

5.3 Mutagenese $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ induzida pelo UV

Com o objetivo de melhor se conhecer a natureza das lesões induzidas por ambas as radiações, foram realizados estudos de mutagênese utilizando cepas com diferentes mutações no códon 461 do gene *lacZ* que codifica a enzima β galactosidase. Esta técnica permite avaliar qual troca de base está ocorrendo, através da restauração do códon inicial. As seis substituições possíveis estão indicadas na figura abaixo.

Códon β galactosidase selvagem		
	---	GGG AAT---GAG---TCA GGC---
		---GLU---
		--- 461---
CC101	A.T→C.G	---
		GGG AAT---TAG---TCA GGC
		↓
		G
CC102	G.C→A.T	---
		GGG AAT---GGG---TCA GGC
		↓
		A
CC103	G.C→C.G	---
		GGG AAT---CAG---TCA GGC
		↓
		G
CC104	G.C→T.A	---
		GGG AAT---GCG---TCA GGC
		↓
		A
CC105	A.T→T.A	---
		GGG AAT---GTG---TCA GGC
		↓
		A
CC106	A.T→G.C	---
		GGG AAT---AAG---TCA GGC
		↓
		G

Figura 20: Mudanças na posição 461 do gene *lacZ*. As substituições de base necessárias para restaurar o códon GAG estão mostradas juntamente com os aminoácidos resultantes da troca para as seis cepas. Apenas o ácido glutâmico na posição 461 restaura o fenótipo original. (adaptado de CUPPLES & MILLER, 1989).

De acordo com os resultados obtidos para o UV-C, observa-se um incremento de mutações nas cepas CC101 (T→G), CC103 (C→G) e CC106 (T→C). Comparando-se o perfil de mutagênese para UV-B com filtro ao obtido para o UV-C, nota-se que há semelhança na indução nas cepas supracitadas. No entanto, para o UV-B com filtro observa-se ainda que há um incremento de mutagênese na cepa CC105 (T→A). Tais resultados apontam que há uma similaridade das lesões induzidas pelas duas regiões do espectro estudadas, além de uma possível lesão particular induzida pelo UV-B com filtro.

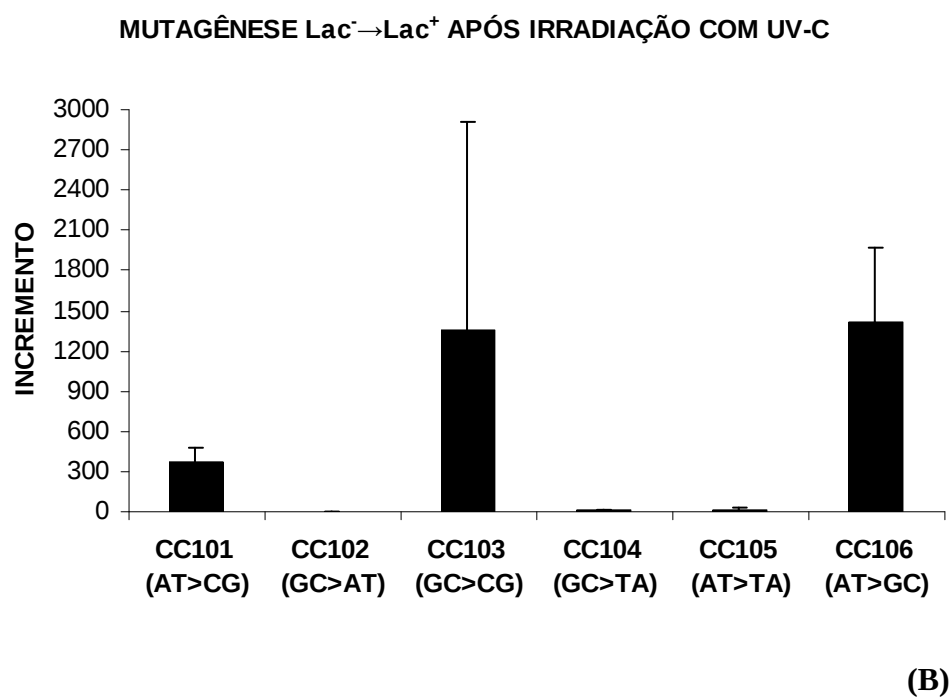
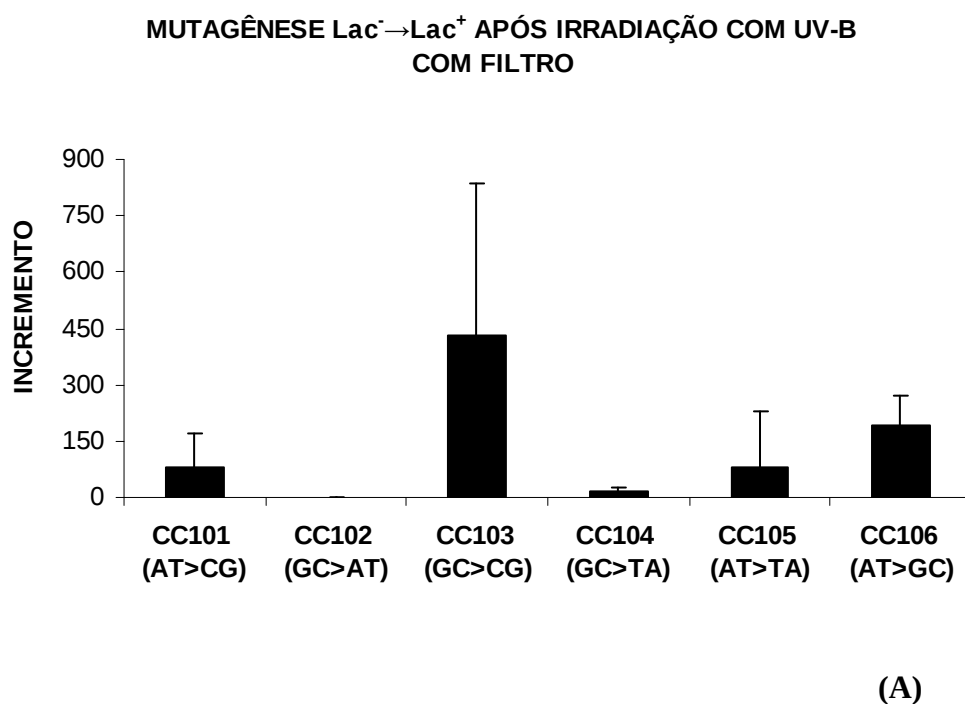


Figura 21: (A) Mutagênese induzida $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ pelo UV-B (com filtro), (B) Mutagênese induzida $\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$ pelo UV-C.

Comparação geral da mutagênese UV-C vs UV-B:

O UV-C induz em média 228 vezes mais mutantes lac^+ por JOULE do que o UV-B.

O UV-C induz em media 76 vezes mais mutantes Rif^R por JOULE do que o UV-B.

Logo, o *locus lacZ* parece responder melhor aos tratamentos pró-mutagênicos.

Lactose

As cepas *lacZ* que responderam ao UV-C possuem *hot spots* típicos de lesões DIMÉRICAS, enquanto que a mutagênese para o UV-B parece decorrer de lesões formadas sob forma DIMÉRICA E MONOMÉRICA.

As cepas portadoras de sequências DIMERIZÁVEIS apresentam níveis mais altos de mutagênese ao UV-C, enquanto aquelas que dependem de trocas em regiões NÃO DIMERIZÁVEIS (ou seja, a troca ocorreria em sítios de lesão monomérica), apresentam níveis mais baixos de mutagênese.

Rifampicina

A mutagênese de aquisição de resistência a rifampicina induzida tanto pelo UV-C quanto pelo UV-B foi DUAS VEZES SUPERIOR quando a deficiência em UDG foi adicionada ao *background uvrA*.

Quadro 3: Indução de revertentes *lac*⁺ quantitativamente analisados como mutantes induzidos por 10⁸ células por J.m⁻².

CEPA	Hot spot	Dose UV-B (J.m ⁻²)	Mut/10 ⁸	Mut/J.m ⁻²
SELVAGEM	GGG AAT---GAG---TCA GGC CCC TTA---CTC---AGT CCG	----	----	----
CC101 (T→G)	GGG AAT---TAG---TCA GGC CCC TTA---ATC---AGT CCG	4000	4,58	0,0011
CC102 (G→A)	GGG AAT---GGG---TCA GGC CCC TTA---CCC---AGT CCG	4000	0	----
CC103 (C→G)	GGG AAT---CAG---TCA GGC CCC TTA---GTC---AGT CCG	4000	15,38	0,0040
CC104 (C→A)	GGG AAT---GCG---TCA GGC CCC TTA---CGC---AGT CCG	4000	11,14	0,0030
CC105 (T→A)	GGG AAT---GTG---TCA GGC CCC TTA---CAC---AGT CCG	4000	10,69	0,0027
CC106 (A→G)	GGG AAT---AAG---TCA GGC CCC TTA---TTC---AGT CCG	4000	8,92	0,0022
CEPA	Hot spot	Dose UV-C (J.m ⁻²)	Mut/10 ⁸	Mut/J.m ⁻²
SELVAGEM	GGG AAT---GAG---TCA GGC CCC TTA---CTC---AGT CCG	----	----	----
CC101 (T→G)	GGG AAT---TAG---TCA GGC CCC TTA---ATC---AGT CCG	50	37,29	0,75
CC102 (G→A)	GGG AAT---GGG---TCA GGC CCC TTA---CCC---AGT CCG	50	0	----
CC103 (C→G)	GGG AAT---CAG---TCA GGC CCC TTA---GTC---AGT CCG	50	54,71	1,09
CC104 (C→A)	GGG AAT---GCG---TCA GGC CCC TTA---CGC---AGT CCG	50	2,99	0,06
CC105 (T→A)	GGG AAT---GTG---TCA GGC CCC TTA---CAC---AGT CCG	50	11,92	0,24
CC106 (A→G)	GGG AAT---AAG---TCA GGC CCC TTA---TTC---AGT CCG	50	41,30	0,82

6.0 Discussão

Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a radiação ultravioleta é capaz de modificar várias estruturas moleculares, incluindo o DNA. As alterações na molécula de DNA são as que têm maior significado biológico, devido à geração de mutações e conseqüentemente aumentando as chances do desenvolvimento de câncer de pele (MARROT & MEUNIER, 2008). Apesar da região correspondente ao UV-A, ter a capacidade de penetrar em camadas mais profundas da pele (IOVINE *et al.*, 2009), grande parte do efeito carcinogênico da radiação UV é atribuído à porção do UV-B, com possível participação da região do UV-A na indução de melanoma (LEE & PFEIFER, 2003).

As principais lesões produzidas pelas radiações UV-C e UV-B descritas na literatura incluem os fotoprodutos formados por absorção direta dos fótons, que são os dímeros de pirimidinas ciclobutano e o fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona. Os outros tipos de danos encontrados são as roturas em fita simples e em fita dupla, e várias bases modificadas, como por exemplo, 8-oxoguanina, glicol de timina, 5,6-diidrotimina e o fotoidrato de citosina (JIANG *et al.*, 2009). Em relação à radiação UV-A, estima-se que seus efeitos ocorram através da fotossensibilização de cromóforos endógenos, gerando espécies reativas de oxigênio (KULUNCSIS *et al.*, 1999). Trabalhos recentes mostraram que o UV-A é capaz de produzir lesões diretas no DNA, do tipo CPD, mas sua energia não é suficiente para a formação do 6-4 PP. No entanto, a participação dessa lesão na mutagênese induzida por esta região do espectro ainda gera controvérsias, e a mutagênese continua sendo explicada por conta das lesões oxidativas (BIVERSTAL *et al.*, 2008); (JIANG *et al.*, 2009).

No presente trabalho objetivou-se o estudo das lesões induzidas pela região do UV-B, bem como verificar a mutagênese associada a essa região do espectro. Como

modelo de estudo foram utilizadas diferentes cepas de *Escherichia coli*, deficientes em genes importantes de reparo de DNA.

Grande parte dos trabalhos realizados com o intuito de se conhecer as lesões induzidas pela radiação ultravioleta utilizaram a região do UV-C como objeto de estudo. Em verdade, esta região do espectro solar não é de interesse biológico, uma vez que não alcança a superfície da Terra (IOVINE, 2009). Em contrapartida, devido aos extensos estudos realizados com essa região do espectro, o UV-C tornou-se uma excelente fonte de comparação entre os efeitos produzidos por outras regiões do UV.

A natureza química das lesões, bem como sua eficiência de produção, depende principalmente do comprimento de onda dos fótons incidentes (SCHUCH *et al.*, 2008). Expondo-se cepas deficientes nos principais genes responsáveis pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER) às irradiações com as diferentes regiões do espectro estudadas, observou-se um perfil de sensibilidade similar para as três porções do UV. No entanto, verificou-se a necessidade de um incremento de dose de acordo com o aumento do comprimento de onda, para se alcançar o mesmo nível de sobrevivência (fig. 1 (A), (B) e (C)). Tais resultados apontam uma similaridade na natureza das lesões, concordando com os dados da literatura, em que a energia dos fótons na região do UV-B é suficiente para a produção de lesões diretas (SCHUCH *et al.*, 2008). Estas lesões são, provavelmente, o CPD e o 6-4PP, já que são as lesões majoritárias encontradas após a irradiação com UV. Tais lesões causam grande distorção na estrutura do DNA, devido à ligação covalente formada entre as duas bases (McATEER *et al.*, 1998); (LEE *et al.*, 2000); (PINES *et al.*, 2009) e são essencialmente reparadas pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Além disso, em nosso trabalho evidenciou-se o aumento da sobrevivência celular após a fotorrestauração, mostrando a atuação da enzima fotoliase mediada por luz visível na correção dos danos causados pelo UV (figuras 16, 17 e 18).

Em *E. coli* que é nosso modelo de estudo, existe apenas a enzima específica para monomerização do fotoproduto do tipo CPD (FRIEDBERG *et al.*, 2006), indicando portanto, que o aumento da sobrevivência (aproximadamente 100 vezes) é devido à retirada desta lesão específica. Além disso, quando se observa os resultados obtidos com os duplo mutantes *uvrA/fpg*, *uvrB/fpg* e *uvrC/fpg*, nota-se claramente um fenótipo NER predominantemente quanto à sensibilidade ao UV (figura 12).

Contudo, resultado interessante foi obtido com as cepas duplo mutantes em *ung phr* (RJF794), que apesar da proficiência em NER, se mostrou mais sensível às três regiões do espectro estudadas (figuras 13, 14 e 15). Estudos mostram que uma lesão pode ser inicialmente reconhecida por diferentes enzimas de reparo, no entanto a interação entre as diversas proteínas de reparo não necessariamente configura uma competição pelo substrato, contrariamente, as diferentes vias podem atuar de forma complementar e cooperativa (YANG, 2008). Estudos de cristalografia por difração de raio X mostram que uma molécula de DNA contendo um CPD resulta em uma torção da cadeia na região da lesão, e simulações de dinâmica molecular revelaram que a ausência do pareamento das bases devido ao CPD gera maior flexibilidade e diminui a energia necessária para a distorção da cadeia de DNA. Sabe-se ainda que quando proteínas de reparo se associam ao DNA lesado a torção do DNA torna-se ainda mais proeminente, aumentando sua flexibilidade. Esta situação pode favorecer o reconhecimento do sítio da lesão por outras proteínas, já que normalmente para a identificação de uma lesão as proteínas reconhecem a conformação do DNA, as pontes de hidrogênio e a distribuição de cargas do DNA, que são alteradas na interação DNA-lesão-proteína (YANG, 2008). Evidências demonstrando a cooperação entre as diferentes vias de reparo já foram descritas na literatura, como por exemplo, a interação entre XPC (proteína NER) e Timina DNA-glicosilase que interagem na retirada de timina erroneamente pareada com

guanina, produzindo um sítio AP (YANG, 2008). Tal caso é similar ao resultado observado em nosso trabalho, em que possivelmente a fotoliase, que já foi descrita como auxiliar o reparo NER (SANCAR *et al.*, 1984), pode interagir com a UDG na identificação da lesão, provavelmente um dímero contendo uracil, para que haja o reparo via NER.

Em relação aos resultados obtidos nos experimentos de mutagênese de aquisição de resistência à rifampicina, percebe-se que a mutagênese das cepas deficientes em *ung* é cerca de duas vezes maior em relação às cepas proficientes nesse gene (figura 19), indicando portanto que a formação de uracil é aumentada após irradiação com UV. Nota-se ainda que o uracil pode surgir sob forma de dímeros CPD, já que após a fotorrestauração a mutagênese é diminuída.

Além da sensibilidade observada para as cepas deficientes em NER, também foi observada sensibilidade das cepas deficientes em BER. Tais resultados podem indicar que o UV-B produz outras lesões que não são substrato para a enzima fotoliase, ou seja, lesões que não são do tipo CPD. Sabe-se, que além das lesões tipo CPD, classicamente envolvendo o reparo via NER, também são associados à radiação UV danos oxidativos produzidos via espécies reativas de oxigênio (ROSEN *et al.*, 1996). As lesões oriundas do ataque de radicais livres são responsáveis pelos danos mais frequentes nas moléculas de DNA. Estas lesões incluem modificações nas bases, na desoxirribose, além de quebras na cadeia fosfodiéster. O reparo por excisão de bases é a principal via de processamento desse tipo de lesão (JIANG *et al.*, 1997).

Com o intuito de investigar o papel dessas lesões na toxicidade produzida pelo UV, foram realizados experimentos de sobrevivência celular utilizando cepas deficientes nos quatro principais genes dessa via em *E. coli*. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura (SOUZA *et al.*, 2006), em que a cepa BW9091 deficiente

no gene *xthA* (exo III) mostrou-se hipersensível ao tratamento com UV-B com filtro (figura 10). Interessantemente, a cepa BH20, deficiente em *fpg* (Fapy), apresentou uma sensibilidade semelhante à cepa BW9091. Para o UV-B sem filtro as cepas BW9091 e BH20, apresentam o mesmo perfil de sensibilidade observado para o UV-B com filtro, no entanto, observa-se uma hipersensibilidade da cepa, deficiente no gene *nfo* (endo IV). Como esperado para o UV-C, nenhuma das cepas testadas mostrou-se sensível ao tratamento, corroborando com os dados da literatura, que relatam a sua capacidade de produzir essencialmente lesões diretas no DNA (BEUKERS *et al*, 2008).

A enzima endonuclease III é uma AP endonuclease com papel importante na remoção de diversas bases alteradas por oxidação, incluindo timina glicol, resíduos de uréia (LASPIA & WALLACE, 1988), bem como produtos de oxidação de citosinas, como por exemplo a 5-hidroxicitosina, 5-hidroxiuracil, uracil glicol dentre outras (JIANG *et al.*, 1997). Assim como ocorre para células deficientes em endo III tratadas com H₂O₂, a ausência desta enzima também não sensibiliza a célula ao tratamento com UV-B (figura 10). Uma possível explicação para o fenótipo observado para a cepa deficiente em *nth* (endo III), é a existência de uma atividade redundante para o reparo dessas bases modificadas, que é desempenhada por uma outra enzima chamada endonuclease VIII. Esta enzima possui a mesma especificidade de substratos que a endo III, podendo, portanto, substituí-la desenvolvendo uma função similar (JIANG *et al.*, 1997). Além disso, os diferentes produtos de oxidações de citosinas através do ataque de radicais hidroxila são observados após irradiação com UV (BARREIROS *et al.*, 2006). Tais produtos de oxidação são bastante estáveis, e vários estudos mostram que uracil glicol, 5-hidroxicitosina e 5-hidroxiuracil, são susceptíveis ao *bypass* pela DNA polimerase. Os derivados de uracil, como o uracil glicol e 5-hidroxiuracil sempre pareiam com adenina, por isso são lesões potencialmente mutagênicas. A 5-

hidroxicitosina pode parear com guanina e com adenina, e raramente pareia com citosina. Oxidações em citosinas têm um caráter essencialmente mutagênico e não letal, gerando transições do tipo C→T e transversões de C→G (WALLACE, 2002). No presente trabalho utilizou-se um conjunto de seis cepas que nos permitiu analisar a frequência de substituições de bases através do monitoramento da reversão de Lac⁻ para Lac⁺ (CUPPLES & MILLER, 1989). Em nosso estudo observou-se um incremento de cerca de 400 vezes na indução de transversões do tipo C→G para o UV-B com filtro e de aproximadamente 1200 vezes para o UV-C. Tais resultados apontam uma possível participação da lesão 5-hidroxicitosina pareando com citosinas.

A hipersensibilidade da cepa deficiente em *xthA* ao UV-B, já havia sido descrita por nosso grupo. Acredita-se que esta enzima atue no reparo de lesões essencialmente letais, devido à sua extrema sensibilidade ao tratamento (SOUZA *et al.*, 2006). Além disso, o início do reparo de uma lesão oxidativa pode ocorrer através da atividade AP endonuclease da endo III, que catalisa a clivagem da cadeia fosfodiéster por β-eliminação. Dessa forma, a ausência de exo III para completar o reparo, pode ser extremamente tóxica para a célula, já que o terminal deixado por endo III não é substrato para a DNA polimerase I. Esse tipo de terminal pode ser convertido em substrato reconhecível pela DNA polimerase II quando tratado com AP endonucleases de classe II, que são a exo III e a endo IV (LASPIA & WALLACE, 1988).

Similar ao observado para a cepa deficiente em *xthA*, a cepa que não possui a atividade desempenhada por *fpg*, também se mostrou muito sensível ao tratamento com UV-B (figura 10). A função desta enzima é o reparo de lesões oxidativas (ZHARKOV, 2008). Em *E. coli* Fpg é a principal enzima que atua na remoção de 8-oxoguanina e formamidopirimidinas (Fapy) derivadas de guanina ou adenina. As lesões do tipo Fapy têm caráter letal e bloqueiam a DNA polimerase, portanto são muito tóxicas para a

célula. Contudo, em estudo realizado *in vitro*, observou-se que adeninas e guaninas são frequentemente incorporadas pareando com a FapyAdenina, gerando trocas de T→A ou de T→C. A enzima Fpg tem alta especificidade de reconhecimento deste tipo de lesão. Todavia, Fpg também retira FapyAdenina, quando esta se encontra pareada com timina, indicando que esta lesão tem um caráter principalmente deletério (WIEDERHELT *et al.*, 2002). Curiosamente, foi observado um incremento na mutagênese após irradiação com UV-B com filtro de cerca de 100 vezes na cepa CC105, que responde à uma troca de T→A, o mesmo não ocorre para a irradiação com UV-C (figura 21).

Souza e colaboradores (2006) atribuíram à endonuclease IV uma atividade importante na remoção de lesões potencialmente mutagênicas induzidas por UV-B (300-320 nm). Neste caso, Endo IV atuaria via reparo por incisão de nucleotídeos (NIR). Este mecanismo de reparo é independente da atuação de uma DNA glicosilase, alternativamente, em NIR, uma AP endonuclease faz uma incisão adjacente à lesão, sem que haja a retirada da base alterada, gerando um terminal que é reconhecido pela DNA polimerase (DAVIET *et al.*, 2007). A importância biológica desta via de reparo ainda não é bem compreendida, mas acredita-se que o reparo via NIR previna a formação de sítios AP, que são extremamente tóxicos para a célula. Esta via de reparo é acionada para a correção de pirimidinas oxidadas e α -deoxinucleosídeos. O reparo via NIR é iniciado por AP endonucleases, em *E. coli* por Nfo (endo IV) (ZHARKOV, 2008). Em nosso estudo o mesmo resultado para a sobrevivência celular ao UV-B com filtro foi observado (figura 10). Interessantemente, foi observada uma elevada toxicidade após o tratamento com UV-B sem filtro para a cepa deficiente na atividade endonuclease IV (figura 10). Nesta região do espectro ocorre uma “mistura” de efeitos conectados com diferentes comprimentos de onda, favorecendo a produção de diferentes tipos de lesões, além de possibilitar o incremento do número de lesões formadas. A produção do

fotoproduto 6-4 e seu isômero, por exemplo, são lesões que podem ser favorecidas durante irradiação com esta região do espectro (PERDIZ *et al.*, 2000). Essas lesões perturbam a conformação do DNA, pois causam uma torção muito proeminente na dupla fita (FRIEDBERG *et al.*, 2006). A promoção de lesões umas muito próximas das outras podem gerar uma instabilidade na cadeia de DNA produzindo roturas espontâneas. A essas lesões, também conhecidas como lesões aglomeradas (*clustered lesions*), é associada uma grande chance de toxicidade devido ao reparo via BER. Substratos de BER quando muito próximos podem produzir quebras duplas devido à atuação das enzimas na correção dessas lesões (ZHARKOV, 2008). Muitas DNA glicosilases e AP endonucleases vem sendo estudadas com o intuito de melhor se conhecer suas participações no reparo de lesões aglomeradas. Acredita-se que esse tipo de lesão iniba a atuação de outras enzimas após uma primeira incisão, levando ao não processamento da lesão e consequentemente a uma elevada toxicidade do produto gerado (ZHARKOV, 2008). Estudos bioquímicos predizem que células deficientes em DNA glicosilases específicas para retirada de bases alteradas por oxidação são mais resistentes à radiação em relação às células proficientes nestas enzimas. Isto ocorre, pois a ausência de reparo (via produção de sítios AP) previne a formação de roturas no DNA devido ao reparo de lesões muito próximas (WALLACE, 2002). No presente trabalho pode-se observar que cepas duplo mutantes nas principais vias de BER são mais resistentes do que os simples mutantes, indicando que o não processamento da lesão previne contra a toxicidade do tratamento (figura 10 e 11). Em trabalho recente sugere-se que o reparo via NIR atuaria na remoção de lesões aglomeradas e seria uma alternativa ao tradicional reparo por BER em que a formação de um sítio AP é fundamental (DAVIET *et al.*, 2007).

7.0 Conclusão

A radiação UV-B induz a formação tanto de lesões diretas quanto de lesões oxidativas. As lesões diretas são, provavelmente, dímeros de pirimidinas ciclobutano contendo uracil e estas têm grande participação na mutagênese induzida por este agente.

O UV-B sem filtro produz lesões que são substrato para a enzima Endo IV, possivelmente envolvendo o reparo via NIR, que previne a formação de sítios AP devido a atuação do reparo por BER em lesões aglomeradas.

8.0 Considerações finais

O perfil de danos induzidos pelo UV-B tem similaridades qualitativas com o induzido pelo UV-C no que diz respeito à alta geração de lesões diméricas tipo CPD. Ao serem minimizados pela fotorrestauração, tanto a sobrevivência incremental quanto a mutagênese geral sofre redução.

A forte tendência do UV-C em produzir lesões diméricas evidencia-se pelo fenótipo selvagem de cepas deficientes em reparo do tipo BER.

Um aspecto importantíssimo quanto à mutagênese induzida pelo UV (C e B) diz respeito aos dímeros contendo CITOSINAS. As formas T-C, C-T ou CC, quando presentes durante a replicação do DNA em *E. coli*, podem gerar trocas do tipo C:G→A:T quando processadas por polimerases que inserem A em frente a substratos não-codificantes, ou quaisquer outros tipos de trocas se processados por Mutapolimerases, como a DNA polimerase V. Todavia, a mutagênese de reversão para utilização de lactose aponta para trocas de bases que provavelmente foram originadas pela ocorrência de lesões monoméricas em PURINAS, possivelmente 8-oxo-Gua e Fapy-adenina.

O surgimento de URACIL a partir de danos em citosinas constitui um capítulo a parte tanto na mutagênese quanto na inativação celular, revelado neste trabalho. A mutagênese Rif^R DOBRA quando o gene *ung* é inativado, e, surpreendentemente, a dupla inativação *ung phr* causa um significativo incremento na letalidade ao UV. Possivelmente, como já discutido anteriormente, a Fotoliase colabora com o reconhecimento de CPD, mas, de forma inédita, a enzima UDG aparece como auxiliar no mapeamento de lesões contendo uracil.

Por outro lado e, finalmente, a radiação UV-B possui características modificadoras das lesões dimericas inicialmente formadas. O isômero Dewar 6-4 é exclusivamente formado nessa faixa espectral.

Quadro 4: Quadro comparativo geral das respostas de reparo de DNA e mutagênese induzidas pelo UV.

TIPO DE LESÃO	LESÕES DIMÉRICAS	LESÕES MONOMÉRICAS
PRODUÇÃO	ALTA QUANTIDADE	BAIXA QUANTIDADE
REPARO ENVOLVIDO	NER, PHR e UDG	BER (FPG, UDG) e NIR

9.0 Perspectivas

- Estudos de mutagênese e inativação em bactéria e em eucarioto em interação de comprimentos de onda na região do UV, em função de mecanismos de reparo de DNA;
- Análise molecular das lesões em espectrometria de massas.

10.0 Referências bibliográficas

ATEER K., JING Y., KAO J., TAYLOR J. S., KENNEDY M. A., Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a Cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA, **J.Mol.Biol.**, 282: 1013-1032, 1998.

AUBIN, F., Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. **Eur journal dermatology**, 13, 515-523, 2003.

BARREIROS A. L. B. S., DAVID J. M., DAVID J. P., Estresse oxidativo: relação entre espécies reativas e defesa do organismo, **Química Nova**, 29 (1), 113-123, 2006.

BERNEBURG, M., PLETTENBERG, H., KRUTMANN, J., Photoaging of human skin, **Photodermatology photoimmunology & photomedicine**, 16, 239-244, 2000.

BERSARATINA, A., KIM, S., PFEIFER, P. G., Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells, **The FASEB journal**, 22, 2379-2392, 2008.

BEUKERS, R., EKER, A.P.M., LOHMAN, P.H.M., 50 years thymine dimer, **DNA repair**, 7, 530-543, 2008.

BIVERSIAL A., JOHANSON F., JENSSEN D., ERIXON K., Cyclobutane pyrimidine dimers do not fully explain the mutagenicity induced by UV-A in Chinese hamster cells, **Mutation research**, 648, 32-39, 2008.

CHOI, JUN-HYUK, BESARATINA, A., LEE, DONG-HYUN, LEE, CHONG-SOON, PFEIFER, G.P., The role of DNA polymerase ϵ in UV mutational spectra, **Mutation research**, 599, 58-65, 2006.

CUNNINGHAM, P., WEISS B., Endonuclease III (nth) mutants of *Escherichia coli*, **PNAS**, 82, 474-478, 1985.

CUPPLES, C & MILLER, J.; A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* which allow rapid detection of each of the six base substitution, **PNAS**, 86, 5345-5349, 1989.

DAVIET S., COUVÉ-PRIVAT S., GROS L., SHINOZUKA K., IDE H., SAPARBAEV M., ISHCENKO A. A., Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway, **DNA Repair**, 6, 8-18, 2007.

de ALENCAR, T.A.M., LEITÃO, A.C., LAGE, C., Nitrogen mustard- and half-mustard induced damage in *Escherichia coli* requires different DNA repair pathways, **Mutation Research**, 582, 105-115, 2005.

DIFFEY, B.L., Solar ultraviolet radiation effects on biological systems, **Review in Medicine and Biology**, 36 (3): 299-328, 1991.

DIZDAROGLU, M., Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage, **Mutat. Res.**, 531, 109-126, 2003.

DOUKI, T., CADET, J., Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions, **Biochemistry**, 40, 2495-2501, 2001.

EL-MOFTY, M., MOSTAFA, W., YOUSSEF, R., EL-FANGARY, M., ELRAMLY, A.Z., MAHGOUB, D., FAWZY, M., Ultraviolet A in vitiligo. **Photodermatology photoimmunology & photomedicine**, 22, 214-216, 2006.

FRIEDBERG E., A brief history of the DNA repair field, **Cell Research**, 18, 3-7, 2008.

FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., SIEDE, W., WOOD, R.D., SCHULTZ, R.A., ELLENBERGER, T., DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington DC, USA, 2006.

GOOSEN N., MOOLENAAR G.F., Repair of UV damage in bacteria, **DNA repair**, 7 353-379, 2008.

HOUTEN, B.V., CROTEAU, D.L., DELLAVECCHIA, M.J., WANG, H., KISKER, C., 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC system, **Mutation research**, 577, 92-117, 2005.

HOUTEN, B.V., CROTEAU, D.L., SNOWDEN, A., Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: clues to the damage recognition problem, **Bioessays**, 15, 51-59, 1993.

IOVINE B., NINO M., IRACE C., BEVILACQUA M. A., MONFRECOLA G., Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts *in vivo*, **Biochimie**, 91, 364-372, 2009.

ISCHENKO A. A., SAPARBAEV M. K., Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage, 415, **Nature**, 2002.

JACOVIDES C. P., TYMVIOS F. S., ASIMAKOPOULOS D. N., KALTSOUNIDES N. A., THEOHARATOS G. A., TSITOURI M., Solar global UVB (280-315 nm) and UVA (315-380 nm) radiant fluxes and their relationships with broadband global radiant flux at an eastern Mediterranean site, **Agricultural and Forest Meteorology**, 149, 1188-1200, 2009.

JIANG D., HATAHET Z., MALAMEDE R. J., KOWS Y. W., WALLACE S. S., Characterization of *Escherichia coli* Endonuclease VIII, **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (51), 32230-32239, 1997.

JIANG Y., RABBI M., KIM M., KE C., LEE W., CLARK R., MIECZKOWSKI P. A., MARSZALEK P. E., UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly, **Biophysical Journal**, 96, 1151-1158, 2009.

KAPPES, U.P., LUO, D., POTTER, M., SCHULMEISTER, K., RÜNGER, T.M., Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skins cells, **Journal of investigative dermatology**, 126, 667-675, 2006.

KORECK A., SZECHENYI A., MOROCZ M., CIMPEAN A., BELLA Zs. GARACZI E., RAICA M., OLARIU T., RASKO I., KEMENY L., Effects of intranasal phototherapy on nasal mucosa in patients with allergic rhinitis, **Photochemistry and Photobiology**, 89, 163-169, 2007.

KRUTMANN J., BERNEBURG M., Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis, **Journal of photochemistry and photobiology**, 54, 87-93, 2000.

KULMS D. & SCHWARZ T., Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis, **Biochemical Pharmacology**, 64, 837-841, 2002.

KULUNCSICS, Z., PERDIZ, D., BRULAY, E., MUEL, B., SAGE, E., Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artifacts, **Journal of photochemistry and photobiology**, 49, 71-81, 1999.

LAGE, C., de PADULA, M., de ALENCAR, T.A.M., da FONSECA GONÇALVES, S.R., VIDAL, L.S., CABRAL-NETO, J., LEITÃO, A.C., New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in *Escherichia coli* cells, **Mutation Research**, 544, 143-157, 2003.

LAWRENCE N. J., SONG L., DOIG J., RITCHIE A. M., BROWNSTEIN D. G., MELTON D.W., Topical thymine dinucleotide application protects against UVB-induced skin cancer in mice with DNA repair gene (*Ercc 1*)- deficient skin, **DNA Repair**, 8, 664-671, 2009.

LEE, J. H., BAE S. H., CHOI B. S., The Dewar Photoproduct of Thymidylyl(3'-->5')-Thymidine (Dewar Product) Exhibits Mutagenic Behavior in Accordance with the "A Rule", **PNAS**, 97: 4591, 2000

LEE, DONG-HYUN, PFEIFER, G.P., Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis, **The journal of biological chemistry**, 278 (12), 10314-10321, 2003.

LEITÃO A. C., LAGE C., CABRAL-NETO J. B., PADULA M., GOMES R. A., Radiobiologia e fotobiologia, Apostila IBCCF°, UFRJ, 2005.

LIMA-BESSA, K.M., ARMELINI, M.G., CHIGANÇAS, V., JACYSYN, J.F., AMARANTE-MENDES, G.P., SARASIN, A., MENCK, C.F.M., CPDs and 6-PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells, **DNA repair**, 7, 303-312, 2008.

MARROT L. & MEUNIER J. R., Skin DNA photodamage and its biological consequences, **J. Am. Acad Dermatol**, 58, 139-148, 2008.

MARTIN, J.A., LAUBE, S., EDWARDS, C., GAMBLES, B., ANSTEY, A.V., Rate of acute adverse events for narrow-band UVB and psoralen-UVA phototherapy, **Photodermatology photoimmunology & photomedicine**, 23, 68-72, 2007.

MATSUMURA Y., ANANTHASWAMY H., Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, **Toxicology and applied Pharmacology**, 195, 298-308, 2004.

MATZ, H., UV light and its interaction with cutaneous receptors, **Dermatologic clinics**, 25, 633-641, 2007.

MILLER, J.H., A short course in bacterial genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, p 456.

MIYAZAWA, Y., NISHIOKA, H., YURA, K., YAMATO, T., Discrimination of class I cyclobutane pyrimidine dimer photolyase from blue light photoreceptors by single methionine residue, **Biophysical journal**, 94, 2194-2203, 2007.

ORREN, D.K., HEARST, J.E., SANCAR, A., Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrABC-DNA complex by DNA polymerase I, **Journal Biol. Chem**, 267, 780-788, 1992.

PEAK, M.J., PEAK, J.G., MOEHRING, M.P., WEBB, R.B., Ultraviolet action spectra for DNA dimer induction, lethality, and mutagenesis in *Escherichia coli* with emphasis on the UVB region, **Photochemistry and Photobiology**, 40 (5), 613-620, 1984.

PENG, W., SHAW, B.R., Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC→ TT transitions, **Biochemistry**, 35, 10172-10181, 1996.

PERDIZ, D., GRÓF, P., MEZZINA, M., NIKAIDO, O., MOUSTACCHI, E., SAGE, E., Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells, **Journal of biological chemistry**, 275 (35), 26732-26742, 2000.

PFEIFER G., Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. **Journal of biological chemistry**, 276, 44688-44694, 2001.

PFEIFER, G.P., YOU, YOUNG-HYUN, BESARANTINA, A., Mutations induced by ultraviolet light, *Mutation research*, 571- 19-31, 2005.

PINES A., BACKENDORF C., ALEKKEEV S., JANSEN J. G., GRUIJL F. R., VRIELING H., MULLENDERS, L. H. F., Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: Impact on DNA repair and UV-induced skin cancer, **DNA Repair**, 8, 153-161, 2009.

RADMAN M., DNA repair and mutagenesis basic mechanisms, Cour Necker, 2004.

ROCHETTE P. J., LACOSTE S., TERRIEN J. P., BASTIEN N., BRASH D. E., DROUIN R., Influence of cytosine methylation on ultraviolet-induced cyclobutane

pyrimidine dimer formation in genomic DNA, **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.02.008, 2009.

ROSEN, J.E., PRAHALAD, A.K., WILLIAMS, G.M., 8-oxodeoxyguanosine formation in the DNA of cultured cells after exposure to H₂O₂ or with UVB or UVA irradiation, **Photochemistry and Photobiology**, 64(1) 117-122, 1996.

ROZA L., VINK A., Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers, **Journal of photochemistry and photobiology**, 65, 101-104, 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., Molecular cloning, **Cold spring Harbor Laboratory Press**, USA, 2: protocol II p. 182, 1995.

SANCAR A., LINDSEY-BOLTZ L. A., UNSAL-KAÇMAZ K., LINN S., Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, **Annual Review of Biochemistry**, 73, 39-85, 2004.

SETLOW, R.B., The wavelenghts in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis, **PNAS**, 71, (9), 3363-3366, 1974.

SOUSA, M.M.L., KROKAN, H.E., SLUPPHAUG, G., DNA-uracil and human pathology, **Molecular aspects of medicine**, 28, 276-306, 2007.

SOUZA L. L., EDUARDO I. R., PÁDULA M., LEITÃO A.C., Endonuclease IV and Exonuclease III are involved in the repair and mutagenesis of DNA lesions induced by UVB I *Escherichia coli*, **Mutagenesis**, 21, 125-130, 2006.

TU, Y., DAMMANN, R., PFEIFER, G.P., Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers *in vivo*, **Journal of molecular biology**, 284, 297-311, 1998.

VERHOEVEN E, E.E.A., MOOLENAAR, W.C., GOOSEN, N., The presence of two UvrB subunits in the UvrABC complex ensures damage detection in both strands, **EMBO journal**, 21(15), 4196-4205, 2002.

VISNES, T., AKBARI, M., HAGEN, L., SLUPPAHAUG, G., KROKAN, H.E., The rate of base excision repair of uracil is controlled by the initiating glycosylase, **DNA repair**, doi:10.1016/j.dnarep.2008. 07.012, 2008.

WALLACE S. S., Biological consequences of free radical-damaged DNA bases, **Free radical Biology & Medicine**, 33 (1), 1-14, 2002.

WIEDERHELT C. J., DELANEY M. O., GREENBERG M. M., Interaction of DNA containing Fapy.dA or its C-nucleoside analogues with base excision repair enzymes. Implications for mutagenesis and enzyme inhibition, **Biochemistry**, 41, 15838-15844, 2002.

WRZESINSKI M., NOWOSIELSKA A., NIEMINUSZCZY J., GRZESIUK E., Effect of SOS-induced Pol II, Pol IV, and PolV DNA polymerases on UV-induced mutagenesis and MFD repair in *Escherichia coli* cells, **Acta Biochimica Polonica**, 52, 139-147, 2005.

YANG W., Structure and mechanism for DNA lesion recognition, **Cell Research**, 18, 184-197, 2008.

YAROSH, D.B., BOUMAKIS, S., BROWN, A.B., CANNING, M.T., GALVIN, J.W., BOTH, D.M., KRAUS, E., O`CONNOR, A., Measurement of UVB-induced damage and its consequences in models of immunosuppression, **Methods**, 28, 55-62, 2002.

ZHARKOV D.O., Base excision DNA repair, **Cell. Mol. Life Sci**, 65, 1544-1565, 2008.

www.who.int/topics/skin_cancer/en/ acessado em 01.06.2009.

www.inca.gov.br/conteudo acessado em 01.06.2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)