



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

**EFEITO DA METFORMINA EM SISTEMAS DE
REPARO DE DNA**

IZABEL DE LORENA PAULA CLAUDIO

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

IZABEL DE LORENA PAULA CLAUDIO

**EFEITO DA METFORMINA EM SISTEMAS DE
REPARO DE DNA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiopatologia Clínica e Experimental (CLINEX), da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado
do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor em
Fisiopatologia Clínica e Experimental**

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araújo

**Rio de Janeiro
2009**

C615 Claudio, Izabel de Lorena Paula.
Efeito da metformina em sistemas de reparo de DNA / Izabel
de Lorena Paula Claudio.- 2009.
xxiii,103f. : il.

Orientador : Egberto Gaspar de Moura.
Co-orientador : Adriano Caldeira de Araújo.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia: f. 95-103.

1. Metformina - Teses. 2. Agentes hipoglicêmicos - Teses.
3. Reparo do DNA - Teses. 4. Diabetes - Teses. I. Moura,
Egberto Gaspar de. II. Araújo, Adriano Caldeira de. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.747

IZABEL DE LORENA PAULA CLAUDIO

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS PÓS-
GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiopatologia Clínica e Experimental (CLINEX), da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado
do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor em
Fisiopatologia Clínica e Experimental**

Aprovada em: 24 de Novembro de 2009

Banca examinadora:

Prof^o Dr Egberto Gaspar de Moura (orientador)- Doutorado/UERJ

Prof^a Dra Cencita Hosannah Cordeiro de Noronha Pessoa- Doutorado/INCA

Prof^o Dr Nasser Ribeiro Asad- Doutorado/UERJ

Prof^o Dr Roberto J.A.C. Bezerra- Doutorado/UERJ

Prof^o Dr João Gabriel Hosannah Cordeiro- Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro

Suplentes:

Prof^a Dra Marília Martins Guimarães- Doutorado/UFRJ

Prof^o Dr José Carlos Pelielo de Mattos- Doutorado/ UERJ

Revisor: Prof^o Dr: Flávio José da Silva Dantas- Doutorado/UERJ

Rio de Janeiro
2009

"Estudar é ter conhecimento geral do mundo e da vida. Compreender algo que ainda não conhecemos ou não tivemos oportunidade de aprender. Nunca vamos parar de aprender, pois nunca irá dar tempo de aprender tudo o que se precisa".

(Autor desconhecido)

Divino Espírito Santo...

me ilumine e me inspire no que pensar, falar e escrever,

Amém

À todos de minha família,
agradeço as orações e pensamentos positivos, o carinho, a amizade e a compreensão de minha ausência em muitos momentos durante o curso. Mas, não poderia ter feito tudo isto se não tivesse bem pertinho de mim, pessoas tão especiais pelas quais o meu coração transborda de amor e alegria, meu marido, Sylvio, e meus filhos, Carla, Fernanda e Sylvio.

A presente tese foi realizada nos laboratórios de Radio e Fotobiologia do departamento de Biofísica e Biometria e de Fisiologia Endócrina do departamento de ciências fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ. Em colaboração, no Laboratório de Divisão de Genética - INCA

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores, os professores Egberto Gaspar de Moura e Adriano Caldeira de Araújo, um agradecimento especial pelo carinho, a amizade, e a compreensão dispensada a mim durante a orientação deste trabalho;

Aos professores Januário Bispo Cabral Neto e Rosa Estela Caseira Cabral pelo aprendizado nos experimentos iniciais com células eucarióticas;

Ao professor Carlos Frederico Martins Menck, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por, gentilmente, ter fornecido as linhagens celulares MRC5 e XPD;

Aos professores Hector Nicolas Seuánez Abreu e Miguel Ângelo Martins Moreira, pela utilização do laboratório de genética do instituto de pesquisa do INCA, onde foi realizada toda a parte experimental com as linhagens de celulares eucarióticas deste trabalho, e a mestrandia Livia Rosa Fernandes pela orientação do ensaio da Luciferase;

Ao professor Flávio José da Silva Dantas pela amizade e revisão cuidadosa desta tese;

Aos professores convidados para a banca examinadora desta tese;

Desta vez, não tenho como escrever algo para cada um de meus amigos, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara da UERJ, do CLINEX, do Instituto de pesquisa do INCA, do ambulatório 20 da Santa Casa da Misericórdia do RJ, que caminharam junto comigo durante esta trajetória tão longa de mestrado e doutorado, pois poderia correr o risco de, sem querer, omitir o nome de alguém, o que seria imperdoável. Desculpem-me pela falta de tempo, que gerou entre outras falhas, a falta dos brigadeiros em nossas comemorações. Mas agradeço a todos o carinho, amizade, compreensão, ajuda nos experimentos, apoio nos momentos de tribulação, alegria, e a torcida. Sem vocês, nada disto estaria valendo à pena. Aprendi com vocês durante estes anos, que a pesquisa gera companheirismo, pois ninguém faz pesquisa sozinho. Assim, me perdoem por esta frase já conhecida por todos, mas não tem nada mais lindo para resumir o que sinto neste momento:

“AMIGO É COISA PARA SE GUARDAR DO LADO ESQUERDO DO PEITO”

Milton Nascimento

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: BER- DNA glicosilases em <i>E. coli</i>	19
Quadro2: BER- DNA glicosilases em células humanas.....	20
Quadro3: BER- AP endonucleases em <i>E. coli</i> e humanos.....	22
Quadro 4: Associação entre DM e câncer.....	28
Quadro 5: Cepas Bacterianas utilizados no estudo.....	36
Quadro 6: Plasmídeos utilizados no estudo.....	37
Quadro 7: Composição dos meios de cultura e soluções utilizadas no estudo com bactérias.....	38
Quadro 8: Doses de irradiação UVC utilizadas nas diferentes cepas bacterianas.....	41
Quadro 9: Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas para a técnica de Eletroforese Alcalina em Gel de Agarose.....	44
Quadro 10: Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas na Técnica do SOS Cromoteste.....	46
Quadro 11: Meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos com células eucarióticas.....	49
Quadro 12: Doses da irradiação de UVC utilizadas nos experimentos para as linhagens celulares MRC5 e XPD.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de fotoprodutos (CDPs e 6-4 PPs).....	5
Figura 2: Esquema geral dos mecanismos propostos para sinalização na presença de danos no DNA.....	6
Figura 3: Modelo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) em <i>E. coli</i>	12
Figura 4: Mecanismo do NER em eucarioto.....	16
Figura 5: Diagrama de BER em <i>E. coli</i> e mamíferos.....	23
Figura 6: Curva da sobrevivência da <i>E. coli</i> AB1157 à MET	60
Figura 7: Espectro de absorção da MET na faixa de 200 a 400 nm.....	61
Figura 8: Fração de sobrevivência da cepa AB1157 tratada com MET durante 60min.....	62
Figura 9: Fração de sobrevivência da cepa AB1884 tratada com MET durante 60min.....	62
Figura 10: Fração de sobrevivência da cepa AB1885 tratada com MET durante 60min.....	63
Figura 11: Fração de sobrevivência da cepa AB1886 tratada com MET durante 60min.....	63
Figura 12: Fração de sobrevivência da cepa BH20 tratada com MET durante 60min.....	64
Figura 13: Fração de sobrevivência da cepa BW 9091 tratada com MET durante 60min.....	64
Figura 14: Fração de sobrevivência da cepa GY4763 tratada com MET durante	

60min.....	65
Figura 15: Fração de sobrevivência da cepa AB2463 pré-tratada com MET durante 60 min.....	65
Figura 16: Fração de sobrevivência da cepa AB1157 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	67
Figura 17: Fração de sobrevivência da cepa AB1884 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	67
Figura 18: Fração de sobrevivência da cepa AB1885 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	68
Figura 19: Fração de sobrevivência da cepa AB1886 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	68
Figura 20: Fração de sobrevivência da cepa BH20 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	69
Figura 21: Fração de sobrevivência da cepa BW527 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	69
Figura 22: Fração de sobrevivência da cepa BW9091 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	70
Figura 23: Fração de sobrevivência da cepa GY4763 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	70
Figura 24: Fração de sobrevivência da cepa AB2463 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	71
Figura 25: Ensaio do SOS Cromoteste da cepa bacteriana <i>E. coli</i> PQ35 pré tratada	

ou não com MET e irradiada ou não com UVC.....	73
Figura 26: Fração de sobrevivência da cepa AB1885 pNP12 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	74
Figura 27: Fração de sobrevivência da cepa BH20pFPG pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	75
Figura 28: Fração de sobrevivência da cepa BW527 pBW21 pré-tratada com MET e irradiada com UVC.....	75
Figura 29: Eletroforese alcalina em gel de agarose e análise densitométrica do DNA de <i>E. coli</i> AB1157 pré-tratada ou não com 20 mg/ml de MET durante 90 minutos e irradiada ou não com 70J/m ²	78
Figura 30: Eletroforese em gel alcalino de agarose e análise densitométrica do DNA de <i>E. coli</i> AB1157 pré-tratada ou não com 20 mg/ml de MET durante 30 minutos e irradiada ou não com 70J/m ²	79
Figura 31: Fração de sobrevivência da linhagem da célula MRC5 pré tratadas com metformina (1mM) durante 24hs e após irradiadas com UVC.....	83
Figura 32: Fração de sobrevivência da linhagem da célula XPD pré tratadas com metformina (1mM) durante 24hs e após irradiadas com UVC.....	84
Figura 33: Sobrevivência das células MRC5 (selvagem) aos tratamentos com MET e Insulina.....	86
Figura 34: Sobrevivência das células XPD (deficientes na enzima XPD) aos tratamentos com MET e Insulina.....	87
Figura 35: Ensaio Luciferase.....	89
Figura 36: Ação da metformina em sistemas de reparo de DNA.....	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-4 PPs	6-4 pirimidina-pirimidona
AGEs	produtos finais da glicação avançada
AGLs	ácidos graxos livres
AMPK	adenosina monofosfato quinase
AP	apurínico ou apirimidínico
ATM	proteína relacionada com a Ataxia Telangiectasia (Ataxia telangiectasia mutated)
BER	mecanismo de reparo por excisão de bases
BLM	proteína relacionada com a síndrome de Bloom (Bloom syndrome)
BRCA	proteína relacionada com o câncer de mama (breast cancer)
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CPDs	dímeros de pirimidina ciclobutano
CS	Síndrome de Cockayne
CSA	Gene responsável pela S de Cockayne
DAR	reparo associado ao domínio transcricional
DL	dose letal
DM	diabetes mellitus
DMEM	Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica

DPP IV	enzima dipeptidyl peptidase IV
DSB	quebra dupla
E3	enzima de conjugação de ubiquitina
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGF-R	receptor do Fator de crescimento epidermal
EGF-R	receptor do fator de crescimento epidermal
EO	estresse oxidativo
ERO	espécies reativas de oxigênio
fpg	gene que codifica para a síntese de Fpg
Fpg	enzima Formamidopirimidina-DNA glicosilase
Fs	fração de sobrevivência
GLP-1	glucagon-like peptide -1
GGR	reparo global do genoma - “global genomic repair”
HRR	reparo por recombinação homóloga -Homologous Recombination Repair
IGF-1	fator 1 de Crescimento Insulina- like
IGF1-R	receptor do fator de crescimento 1 insulina símile
IRS-1	substrato do receptor de insulina 1
J/m ²	Joule por metro quadrado por segundo
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio dibásico anidro
KCl	cloreto de potássio
LB	Luria-Bertani
LMP	Low melting point
MAPK	proteino-quinase ativada por mitógenos
MET	metformina
ml	mililitro

mM	milimolar
Mg	magnésio
MgSO ₄	sulfato de Magnésio
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	sulfato de magnésio heptahidratado
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato disódio dibásico anidro
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	fosfato monosódio monohidratado
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NMP	normal melting point
nm	nanômetro
ng	nanograma
nM	nanomolar
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
ONPG	(ortho) 2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
PBS	tampão fosfato salina
PNPP	p-nitrophenyl Fosfato Dissódico
Pol 1	polimerase 1
pH	potencial hidrogênico
Rad 51	enzima participante do reparo por recombinação homóloga
RI	receptor de insulina
SDS	dodecil sulfato de sódio
sfiA::lacZ	fusão de operons que codificam para síntese da proteína β- galactosidase
	reparo acoplado à transcrição -‘transcription-coupled-

TCR	repair”
TE	solução Tris-EDTA
TFIIH	complexo de fator de transcrição TFIIH
TTD	Tricotiodistrofia
μL	microlitro
μm	micromolar
UV	Ultravioleta
<i>uvrA,B,C,D</i>	Genes que codificam as enzimas UvrA,B,C,D
V	volts
W	watts
WRN	proteína relacionada com a síndrome de Werner (Werner syndrome)
xg	vezes a gravidade
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum D</i>

ABSTRACT

Cells prevent the formation of injuries in DNA preserving integrity of the genetic information, through repair mechanisms. The accumulation of these injuries or the deficiency in one repair mechanism can produce mutations in cells, leading to neoplastic transformation. Injuries in the DNA can be associated with Diabetes Mellitus (DM) and little is known regarding possible disturbance in the repair system, associated with this syndrome. The use of metformin (MET), a insulin sensitizer, can be associated with reduced incidence and improvement in the prognostic of certain types of cancer in DM. In this study, we are suggesting in prokaryotes and eukaryotes deficient in repair enzymes that MET acts through these enzymes, to protect against the damages in DNA. Cells XPD, deficient in the enzyme of repair XPD, pre-treated with MET (1mM) and radiated with UVC, showed lower survival, evaluated through Trypan Blue test of cell viability in comparison with MRC5 control cells. The same occurring with bacterial strains AB1885, BH20 and AB2463 deficient in repair enzymes UvrB and Fpg and the SOS system, respectively, when pre-treated with MET (20mg/ml=168mM) and radiated with UVC compared with its survival without UVC. Strains AB1885 and BH20 transformed into proficient of all the repair systems through, and submitted to the same treatment with MET and equal dose of UVC the used in the wild strain (AB1157), we observed an increase of its survival. Studying the strains GY4765 (SOS⁺) proficient on the autocatalytic activity of the SOS system, using the same conditions of treatment, also had increase of its survival in relation to the control, being also this system tested through Chromotest SOS where the MET expressed the SOS genes. Through alkaline electroforese in agarose gel to evaluate the repair activity on the bacterial strain AB1157 (proficient of all repair systems) the pre-treatment with MET and irradiation with UVC, confirmed the action of MET in activating repair systems. It was demonstrated, also, the existence of a synergic action of MET and insulin, when cells from patients with of breast cancer of (MCF7), transfected with BRCA1 gene (HRR). The treatment with MET (20mg/ml) did not increase the expression of this gene, but when combined with insulin (10nM) we observed an increase in the expression of this gene, evaluated in the Luciferase assay . When MRC5cells has been submitted to the pre-treatment with MET and insulin and exposed with UVC, had its higher survival of those radiated without insulin. XPD cells, treated with MET and insulin, did not show any protection agains

UVC exposure. In conclusion MET treatment in prokaryotes active DNA repair, but needs UvrB enzymes (NER), fpg (BER) and SOS system to protect the cell against the deleterious effect of the UVC. In eukaryotes, MET needs XPD repair enzyme, (NER) to promote the same protection against the action of the UVC that is bigger when associated with insulin. Possibly, MET also increases the expression of *BRCA1* gene (HRR) when associated with insulin.

RESUMO

Células de todos os organismos vivos restauram lesões em DNA preservando a integridade da informação genética, através de mecanismos de reparo. A não eliminação, ou o acúmulo destas lesões ou a deficiência em uma via de reparo, leva ao acúmulo de mutações em células, podendo contribuir para o câncer. Lesões no DNA podem estar associadas com Diabetes Mellitus (DM) e pouco se sabe a respeito de possíveis distúrbios no sistema de reparo, associado a esta síndrome. A metformina (MET), um sensibilizador de insulina, pode estar associado a incidência reduzida e melhora no prognóstico de certos tipos de cânceres em DM. Neste estudo, estamos sugerindo em eucariotos e procariotos, deficientes em enzimas de reparo de DNA, que a MET, age via enzimas de reparo, para proteger a célula contra os danos em DNA. Isto porque células XPD, deficientes na enzima de reparo XPD, pré-tratadas com MET (1mM) e irradiadas com UVC, tiveram sobrevivência menores, avaliadas através da viabilidade celular pela exclusão do Azul de Trypan, em comparação com controle, MRC5. O mesmo ocorrendo com as cepas bacterianas AB1885, BH20 e AB2463 deficientes nas enzimas de reparo, UvrB e Fpg e do sistema SOS, respectivamente, quando foram pré-tratadas com MET (20mg = 168mM) e irradiadas com UVC comparadas com suas sobrevivências sem UVC. Cepas AB1885 e BH20 transformadas em proficientes de todos os sistemas de reparo e submetidas ao mesmo tratamento com MET, mas com a dose de UVC igual à administrada para a cepa selvagem (AB1157), observou-se um aumento de sobrevivência. E ao se utilizar a cepa GY4765 (SOS⁺), proficiente da atividade autocatalítica do sistema SOS, nas mesmas condições de tratamento, houve também aumento da sobrevivência em relação ao controle, sendo também o sistema testado através do SOS Cromoteste onde a MET expressou este sistema. Através do ensaio da eletroforese alcalina em gel de agarose, onde se avaliou a atividade de reparo da cepa bacteriana AB1157, após o pré-tratamento com MET e irradiação com UVC, confirmou-se a ação da MET em ativar sistemas de reparo do DNA. Demonstrou-se, também, a existência de uma ação conjunta da MET com a insulina, quando em células provenientes de pacientes portadores de câncer de mama MCF7, transfectada com o gene *BRCA1*(HRR), o tratamento com MET (168mM) não expressou este gene, mas o fez, em ação conjunta com a insulina (10nM) quando avaliadas no ensaio de luciferase. Quando células MRC5 foram submetidas ao pré-tratamento com MET(168mM) e insulina(10nM) e

após irradiada com UVC, tiveram sua sobrevivência maiores do aquelas irradiadas sem insulina. Já nas células XPD, esta ação conjunta MET e insulina, não protegeu a célula contra a ação do UVC. Conclui-se que a MET em procariotos, ativa reparo de DNA, necessita das enzimas de reparo UvrB (NER) e fpg (BER) e do sistema SOS para proteger a célula contra os efeitos deletérios do UVC. Em eucariotos, a MET, necessita da enzima de reparo de DNA, XPD (NER) para promover a mesma proteção contra a ação do UVC, que é exacerbada, quando associada a insulina. Possivelmente, a MET, também expressa o gene *BRCA1* (HRR) quando associada à insulina.

SUMÁRIO

Página

INTRODUÇÃO

I. Considerações Iniciais.....	1
II. Lesões no DNA.....	2
1. Lesões espontâneas.....	2
2. Lesões devido o ambiente.....	3
III. Resposta do metabolismo celular em presença de lesões no DNA.....	6
IV. Mecanismos de reparo do DNA de importância para este trabalho.....	8
1. Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em <i>Escherichia coli</i>	8
2. Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em Eucariotos.....	13
3. Mecanismo de reparo por excisão de bases (BER).....	18
4. Mecanismo de reparo por recombinação homóloga (HRR).....	24
5. Regulação da resposta SOS.....	25
V. DM e sistema de reparo.....	26
VI. DM e câncer.....	26
VII. Cloridrato de Metformina	28

OBJETIVOS

I. Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos.....	32

MATERIAL E MÉTODOS

I. Experimentos de sobrevivência com bactérias.....	34
1. Conservação das cepas bacterianas.....	34
2. Cultura de bactérias.....	37
3. Obtenção das Culturas Bacterianas.....	38
4. Avaliação da absorvância da MET ao UVC.....	38
5. Tratamento da cepa AB1157 com diversas doses de metformina.....	38
6. Tratamento de cepas bacterianas com metformina.....	39
7. Transformação das cepas bacterianas.....	41
8. Determinação das frações de sobrevivência das cepas bacterianas e análise estatística.....	42
9. Avaliação do reparo do DNA , induzido pela MET, através da Técnica de Eletroforese em Gel Alcalino de Agarose.....	43
10 Avaliação da indução do sistema SOS pela MET, através da Técnica do SOS Cromoteste.....	46

II. Cultura de células humanas.....	49
1. Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas neste Estudo.....	49
2. Linhagens de Células.....	49
3. Cultura de Células.....	50
4. Subcultivo de Células.....	50
5. Congelamento de Células.....	51
6. Descongelamento das Células.....	52
III. Experimento com células eucarióticas.....	52
1. Avaliação da eficiência de plaqueamento com as linhagens MRC5 e XPD.....	52
2. Escolha da dose de metformina a ser utilizada nos experimentos.....	52
3. Escolha da dose de UVC para serem utilizadas nos experimentos posteriores.....	53
4. Experimentos de sobrevivência celular.....	54
5. Ensaio Luciferase.....	57
RESULTADOS E DICUSSÃO.....	58
1. Escolha da concentração da metformina.....	59
2. Espectro de absorção da metformina na região espectral do UVC.....	61
3. Cinética de inativação de cepas bacterianas.....	62
A. Tratamento das cepas bacterianas com MET.....	62
B. Pré-tratamento das cepas bacterianas com MET seguida da irradiação com UVC.....	66
4. SOS Cromoteste.....	73
5. Cinética de inativação das cepas bacterianas transformadas pré-tratadas com MET, seguido da irradiação com UVC.....	74
6. Eletroforese alcalina em gel de agarose.....	76
7. Experimento com células eucarióticas.....	80
A. Escolha da concentração da metformina.....	81
B. Sobrevivência das células MRC5 e XPD pré-tratadas com MET e após, irradiadas com UVC.....	82

C. Sobrevivência das células MRC5 e XPD pré-tratadas ou não com MET e insulina e, posteriormente, irradiadas com UVC.....	85
D. Ensaio Luciferase.....	88
CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

INTRODUÇÃO

I. Considerações iniciais

James Watson e Francis Crick em 1953 sugeriram que, a estrutura da molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA), seria uma macromolécula provida de alta estabilidade. Esta visão retardou sérias considerações de processos bioquímicos tais como mutação e reparo. Subseqüentemente, o trabalho dos três “Rs” do metabolismo do DNA – Replicação, Recombinação e Reparo, demonstrou o estado dinâmico do DNA. Este conceito trouxe a evidência que o DNA em todos os organismos vivos, apresenta continuamente grande número de lesões e que as células têm engenhosos mecanismos para tolerar e reparar estes danos. A falência destes mecanismos pode provocar doenças humanas como câncer (Friedberg, 2003).

Hermann Muller, geneticista, em seu trabalho com *Drosophila* foi quem primeiro demonstrou que agentes externos, químicos ou físicos, podem causar mutações em organismos vivos. Com o desenvolvimento da física colaborando para o estudo dos genes, logo surgiram indagações a respeito de como agentes do tipo radiação ultravioleta (UV) poderiam danificar o DNA e de como as células suportariam estas lesões. O efeito letal do UV foi descrito em 1930, e a descoberta da existência de mecanismos de reparo do DNA, em 1940. Neither Kelner e Renato Dulbecco, usando a radiação UV como ferramenta experimental, observaram taxas de sobrevivência anômalas quando bactérias infectadas com vírus eram expostas a longos comprimentos de onda, como a luz solar ou a luz fluorescente, levando assim à descoberta do fenômeno, agora chamado, de fotorreativação por meio do qual o DNA lesado pela exposição à luz UV é reparado por uma reação enzimática foto-dependente. O reparo destas lesões pôde ser monitorado experimentalmente, e possibilitou as descobertas por Setlow, e outros autores, de outros mecanismos de reparo como por exemplo o reparo por excisão em bactérias e em organismos superiores (Friedberg, 2003).

O reparo do DNA, agora apresenta não somente a reversão direta de muitos tipos de danos, mas também múltiplos mecanismos distintos para retirada de bases danificadas. O princípio dos mecanismos de reparo por excisão de DNA envolve a abertura e retirada da região lesada e a síntese de uma fita nova para ocupar o espaço vazio, seguido pela união

dos fragmentos. Se não reparadas, as lesões promovem instabilidade na integridade genômica. Adicionalmente, as células eucarióticas têm muitas vias de sinalização complexas para reprimir a progressão do ciclo celular, na presença de dano no DNA, com o objetivo de aumentar o tempo para a ação do reparo e de mecanismos de tolerância. Finalmente, quando a lesão ao DNA é muito importante, e não são reparadas, a célula é capaz de programar sua morte (apoptose), promovendo a eliminação de uma população diferente que poderia acarretar sérias conseqüências patológicas como, por exemplo, um câncer. Assim, a vida é um delicado balanço entre estabilidade e instabilidade genômica e de mutação e reparo (Friedberg, 2003).

II. Lesões no DNA

A molécula de DNA tem sua estrutura química modificada constantemente por agentes físicos e químicos, que podem ser externos ou gerados pelo próprio metabolismo celular. Lesões no DNA podem ser classificadas em espontâneas e ambientais, embora sejam indistinguíveis entre elas (Friedberg *et al.*, 1995).

1) Lesões espontâneas: Aparecem durante o metabolismo do DNA. O dano oxidativo, consiste de lesões provocadas pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), é considerada a maior fonte deste tipo de alterações para o DNA, proteínas, lipídeos, e carboidratos. A maior fonte intracelular de ERO é a redução monoelétrica do oxigênio, durante a respiração celular. Existe extensa discussão a respeito da relevância de lesões espontâneas para o processo de envelhecimento e câncer em humanos (Friedberg *et al.*, 1995).

2) Lesões devido ao ambiente:

A radiação ultravioleta: É um dos principais agentes físicos gerador de lesões na molécula de DNA, possuindo grande importância biológica, pois é responsável por diversas respostas importantes, benéficas ou não, em células do organismo, tais como estímulo na formação de vitamina D ou a indução de câncer (Van der Leun, 1996). A radiação UV pode ser dividida em três faixas, de acordo com o comprimento de onda: UV-A: (400-320 nm)- comprimentos de onda que são pouco barrados pela camada de ozônio. A maioria da radiação UV-A é capaz de alcançar a superfície terrestre e causar a aceleração do processo de envelhecimento de células da pele, danos no globo ocular e supressão do sistema imune (Friedberg *et al.*, 1995).

UV-B: (320-290 nm)- comprimentos de onda que são fortemente barrados pela camada de ozônio. Queda nos níveis de ozônio estratosférico significa que mais radiação UV-B possa alcançar a superfície terrestre, causando queimaduras solares, supressão de células do sistema imune e uma variedade de problemas de pele como câncer e aceleração do processo de envelhecimento (Friedberg *et al.*, 1995).

UV-C: (290-100 nm)- comprimentos de onda extremamente barrados pela camada de ozônio. A radiação UV-C constitui uma das principais ferramentas utilizadas em laboratório para estudo dos efeitos da irradiação ultravioleta nos organismos. A exposição de bactérias e células de mamíferos em cultura a lâmpadas germicidas em laboratório (254nm) marca o início do modelo mais amplamente usado para se explorar as consequências do dano ao DNA, sua tolerância e reparo (Friedberg *et al.*, 1995).

A exposição da molécula de DNA ao UV tem como consequência a formação de fotoprodutos como, por exemplo, quebras simples e duplas e outras reações fotoquímicas (Murphy, 1975; Pfeifer, 1997). Os fotoprodutos mais importantes (figura 1), devido aos efeitos biológicos gerados, são os dímeros de pirimidina ciclobutanos (cyclobutane pyrimidine dimers- CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP):

Lesões CPDs: ocorrem quando bases pirimidínicas adjacentes, ao absorverem energia da radiação UV, tornam-se covalentemente ligadas pela formação de um anel

ciclobutano. Logo, a formação destas lesões acarreta uma distorção na molécula do DNA, interferindo na sua estrutura normal, alterando a dinâmica de proteínas e sistemas regulatórios na célula. Estas lesões são extremamente estáveis. Os efeitos produzidos na célula por lesões CPDs são considerados mais importantes, pois estas são geradas em maior quantidade (Miychell & Nairn, 1989), reparadas mais lentamente (Yoon *et al.*, 2000) e responsáveis pela maioria das mutações geradas em células de mamíferos.

Lesões 6-4PPs: São formadas por uma ligação não cíclica nas posições C-6 e C-4. Estes fotoprodutos geram uma maior distorção na dupla hélice em comparação aos CPDs (Friedberg *et al.*, 2003).

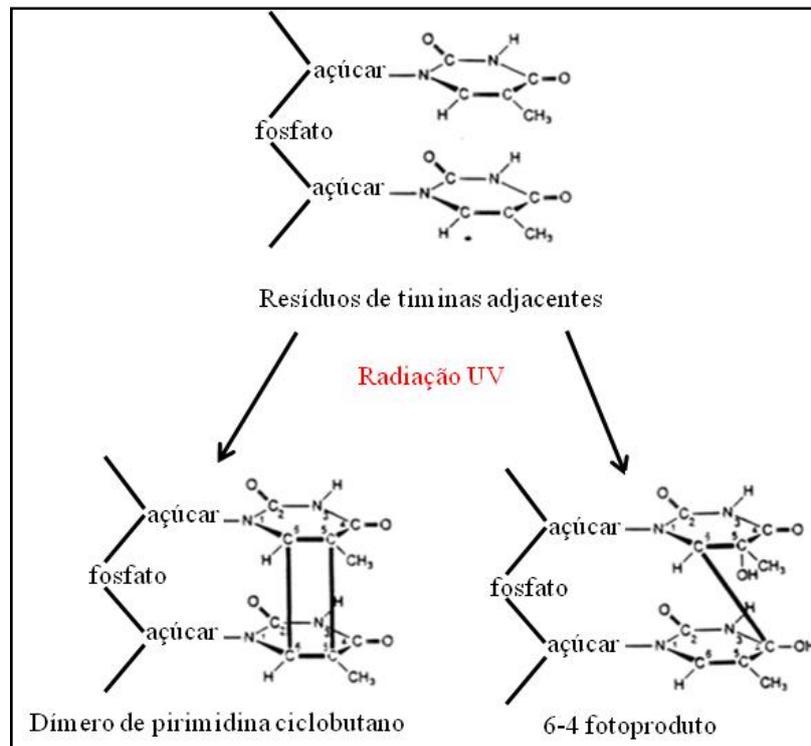


Figura 1: Formação de fotoprodutos (CDPs e 6-4 PP) (adaptado de Svobodova, 2006)

Estresse oxidativo (EO): é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de defesas antioxidantes. As ERO são formadas no organismo

em condições fisiológicas (cadeia respiratória) e fisiopatológicas como no diabetes mellitus - DM (Rahbar & Figarola, 2003; Friedberg *et al.*, 2006).

III. Resposta do metabolismo celular em presença de lesões no DNA em eucariotos.

A presença de lesões no DNA devido agentes externos ou internos gera respostas no metabolismo celular (figura 2).

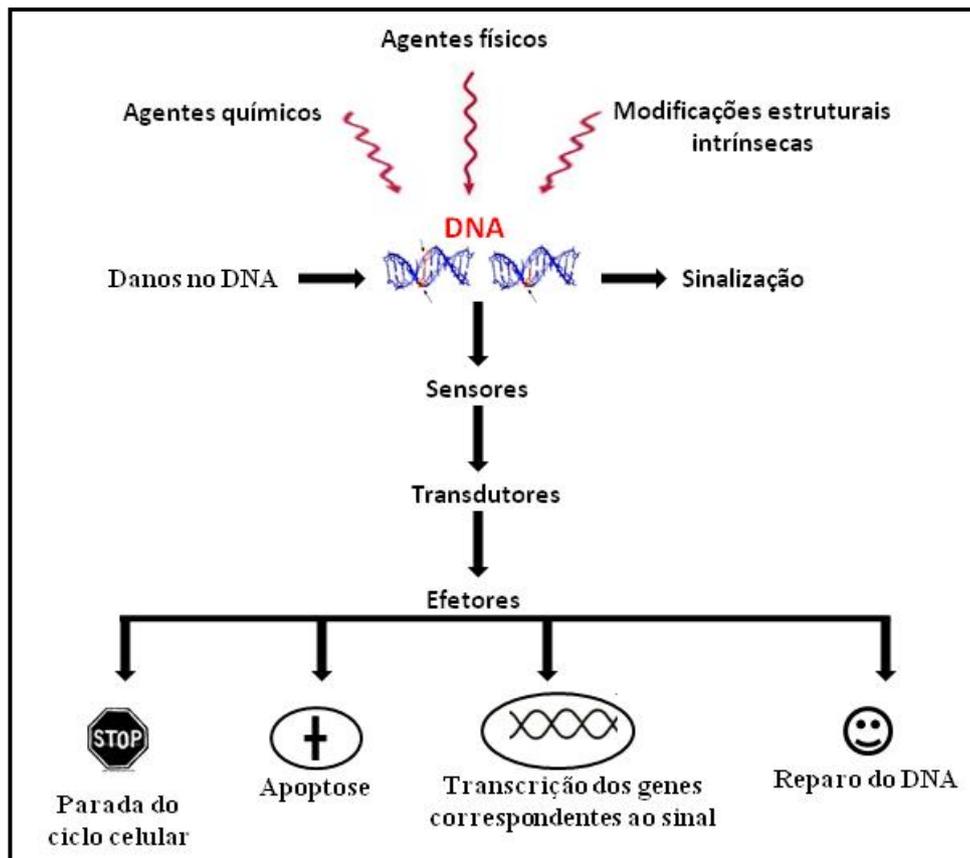


Figura 2: Esquema geral dos mecanismos propostos para sinalização na presença de danos no DNA (Zhou & Elledge, 2000)

Lesões do tipo fotoprodutos, principalmente CDPs: **i)** bloqueiam a progressão da replicação **ii)** bloqueiam a transcrição, afetando principalmente a enzima RNA polimerase II e alterando os níveis de expressão gênica na célula; **iii)** inibem a ação de enzimas que atuam em processos de reparo de DNA, pela perda da capacidade de reconhecer e sinalizar o reparo destas lesões; **iv)** a detecção destas lesões leva à ativação de mecanismos de ponto de checagem do ciclo celular, estabelecendo um bloqueio do ciclo para o reparo das lesões, antes que estas se tornem mutações permanentes; **v)** dependendo da quantidade de lesões presentes na célula, a maquinaria de reparo pode não conseguir eliminá-las em sua totalidade resultando em síntese translesão, podendo fixar mutações na sequência de DNA, ou ainda induzir morte celular (Thomas & Kunkel, 1993).

Lesões oxidativas: **i)** ativam vias metabólicas enzimáticas e não enzimáticas; **ii)** aumentam a expressão de genes e mediadores de dano celular e tecidual; (Johansen, *et al.*, 2005; Gil-del-Valle, *et al.*, 2005).

IV. Mecanismos de reparo do DNA de importância para este trabalho

Mecanismos de reparo de DNA são vias bioquímicas pelas quais bases danificadas, ou mal emparelhadas, são restauradas à sua forma nativa na molécula de DNA. Acredita-se que estes mecanismos tenham aparecido cedo no decorrer da evolução, uma vez que desde o surgimento da vida em nosso planeta os organismos tiveram que lidar com os efeitos genotóxicos da irradiação solar (Friedberg, 2001).

1. Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *Escherichia coli*

O NER foi descoberto a partir da análise do reparo das lesões causadas pelo UV-C, também conhecido como UV germicida, tendo como alvo principal o DNA e, as principais lesões geradas, os dímeros de pirimidina (Friedberg *et al.*, 2006).

Durante anos uma série de experimentos realizados com *E. coli.*, por Setlow & Carrier (1963) e por Boyce & Howard-Flanders (1964) observou-se que células lesadas com UV-C possuíam algum tipo de reparo funcionando. Experimentos feitos por Pettijohn & Hanawalt (1964), indicaram a existência de um reparo seguido de síntese de DNA nas células expostas à radiação UV-C, os quais eram estudados em bactérias selvagens ou mutantes para os genes *uvr*. Se as enzimas de reparo presentes nas bactérias fossem capazes de recuperar o DNA do bacteriófago lesado com UV-C, o número de plaques de lise contado era maior, ou seja, de acordo com a sobrevivência do bacteriófago era possível inferir se havia ou não o reparo do DNA na bactéria. O reparo responsável por esses fenômenos foi chamado de reparo por excisão de nucleotídeos.

Os principais genes envolvidos no NER: O uso de técnicas que revelaram a presença de quebras na fita simples de DNA, estabeleceu que os genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* estão presentes durante a incisão de nucleotídeos do DNA contendo dímeros de pirimidinas. Esse processo específico de incisão mostrou-se dependente também de Mg^{2+} ou Mn^{2+} e de ATP. Além disso, dois outros genes, *uvrD* e *polA* (envolvidos na excisão dos fragmentos e síntese de nucleotídeos para o preenchimento das lacunas deixadas) foram implicados neste processo (Friedberg *et al.*, 2006).

Proteína UvrA, produto do gene *uvrA*:

O gene *uvrA* faz parte da maquinaria SOS, que consiste, entre outros, de genes reguladores da codificação de proteínas necessárias para o reparo, o aumento de seus níveis de transcrição são induzidos por agentes que causam lesões no DNA. A expressão dos genes SOS é regulada por uma proteína repressora chamada LexA, produto do gene *lexA*. A LexA repressora se liga a um sítio promotor de *uvrA* (Friedberg *et al.*, 2006; Truglio JJ, *et al.*, 2006).

A proteína UvrA é membro de uma super-família de ATPases em procariotos, muitas das quais são proteínas que se ligam à membranas plasmáticas e ao DNA com baixa afinidade e sem especificidade, mas na presença de ATP, a proteína liga-se mais especificamente ao DNA lesado. Embora essa ligação dímero UvrA-DNA, tenha uma vida curta, se dissociando rapidamente, ela é permitida pela interação específica com a proteína UvrB (Friedberg *et al.*, 2006).

Proteína UvrB, produto do gene *uvrB*:

A transcrição *in vitro* deste gene ocorre através de dois promotores, P₁ e P₂. A proteína LexA liga-se ao sítio da região promotora. Este gene é regulado pelo sistema SOS e é induzido por lesões no DNA. A sua transcrição parece ser controlada por ambos os promotores, o dependente e o independente de SOS. *In vitro*, P₂ parece funcionar como um operador de SOS, sendo assim, a transcrição de UvrB sobre o controle de P₂ é inibida na presença da proteína repressora LexA, enquanto P₁ não é afetado. Há evidências de que, P₁ determine a transcrição de UvrB e P₂ sirva para regular a transcrição de P₁. Um terceiro promotor, P₃ foi identificado, mas pouco se sabe a seu respeito (Friedberg *et al.*, 2006).

A proteína UvrB, não apresenta atividade ATPase, embora exista indicações de que ela possa ter um sítio ATPase, que se ative somente quando ligado à proteína UvrA. UvrB interage especificamente com a UvrA e o complexo proteína-proteína se liga ao DNA (Friedberg *et al.*, 2006, Truglio *et al.*, 2006).

Proteína UvrC, produto do gene *uvrC*:

O gene *uvrC* não é induzido por danos no DNA, não fazendo parte dos membros sob regulação SOS. Uma proteína homóloga a UvrC que induz SOS foi descrita, sendo codificada pelo gene *cho* (Friedberg *et al.*, 2006).

UvrC não se associa às UvrA e UvrB em solução, mas tem uma extrema afinidade pelo complexo UvrB-DNA (Uchida *et al.*, 2002; Friedberg *et al.*, 2006).

Principais etapas do NER

Reconhecimento da base lesada no DNA durante o NER:

Um aspecto fundamental de especificidade do NER é a habilidade da maquinaria do reparo em localizar e identificar diversos tipos de nucleotídeos lesados no DNA, um processo chamado de “reconhecimento dano-específico” (Friedberg *et al.*, 2006).

A proteína UvrA dimerizada (UvrA₂) associa-se com UvrB formando o complexo (UvrA)₂UvrB, na presença de ATP. Este complexo tem afinidade maior com o DNA lesado do que a UvrA sozinha. Assim, é sugerido o nome para a UvrA, no NER, de “casamenteira molecular” (molecular matchmaker), levando UvrB ao sítio de distorção no DNA lesado, através da formação do complexo (Friedberg *et al.*, 2006).

Na presença do complexo (UvrA)₂UvrB e ATP, o DNA desenrola-se, sugerindo uma atividade helicase em torno do sítio da lesão. Assim, o complexo pode abrir o DNA localmente em duas fitas simples e se deslocar, então, por esse DNA não lesado em fita simples até o sítio da lesão, ocorrendo uma translocação para a formação do complexo pré-incisão, DNA-proteína. Em resumo, a evidência é de que o dímero UvrA se ligue a UvrB, formando o complexo (UvrA)₂UvrB, ligando-se ao DNA, não especificamente, de forma a desenrolá-lo e se translocar unidirecionalmente até que o sítio da lesão bloqueie esta translocação, gerando um complexo de alta afinidade (UvrA)₂UvrB-DNA (Friedberg *et al.*, 2006).

Formação do complexo de incisão:

Quando o sítio de base lesada é encontrado pelo complexo (UvrA)₂UvrB, o DNA é desenrolado. Então o dímero UvrA se dissocia e o complexo UvrB-DNA é estabelecido, estando assim o DNA pronto para a incisão. O passo final na preparação da atividade catalítica da endonuclease-lesão específica é a ligação da UvrC ao complexo pré-incisão UvrB-DNA. Para tanto, o ATP é requerido para a UvrC unir-se a UvrB-DNA (Friedberg *et al.*, 2006).

Incisão do DNA:

A incisão do DNA é bimodal, ou seja, as incisões são feitas em dois sítios enzimáticos distintos. A incisão 3' é efetuada por UvrB, e essa incisão precede o corte 5' catalisado pela proteína UvrC, indicando a existência de duas atividades endonuclease, fisicamente distintas, no processo UvrABC (Friedberg *et al.*, 2006).

Excisão e ressíntese do DNA:

A proteína UvrD (DNA helicase II) possui um papel auxiliar no NER. O mecanismo preciso pelo qual Pol I e DNA helicase II efetuam os deslocamentos tanto das proteínas UvrB e UvrC quanto do oligonucleotídeo contendo a lesão ainda não está claro. Parece então que, seguido à incisão, a DNA helicase II desliga a UvrC e o oligonucleotídeo onde está a lesão, deixando apenas o complexo UvrB-lacuna-DNA, no qual a UvrB protege a fita simples de DNA de uma degradação inespecífica. Pol I liga-se à terminação 3'-OH gerada pela incisão 5' e desloca a UvrB durante o processo de síntese de reparo (Friedberg *et al.*, 2006).

Ligação do DNA:

O evento bioquímico, após a síntese de reparo, é a junção do recém sintetizado oligonucleotídeo à cadeia do DNA. Este evento é catalisado pela DNA ligase (Friedberg *et al.*, 2006). A figura 3 resume as etapas de NER em procariotos.

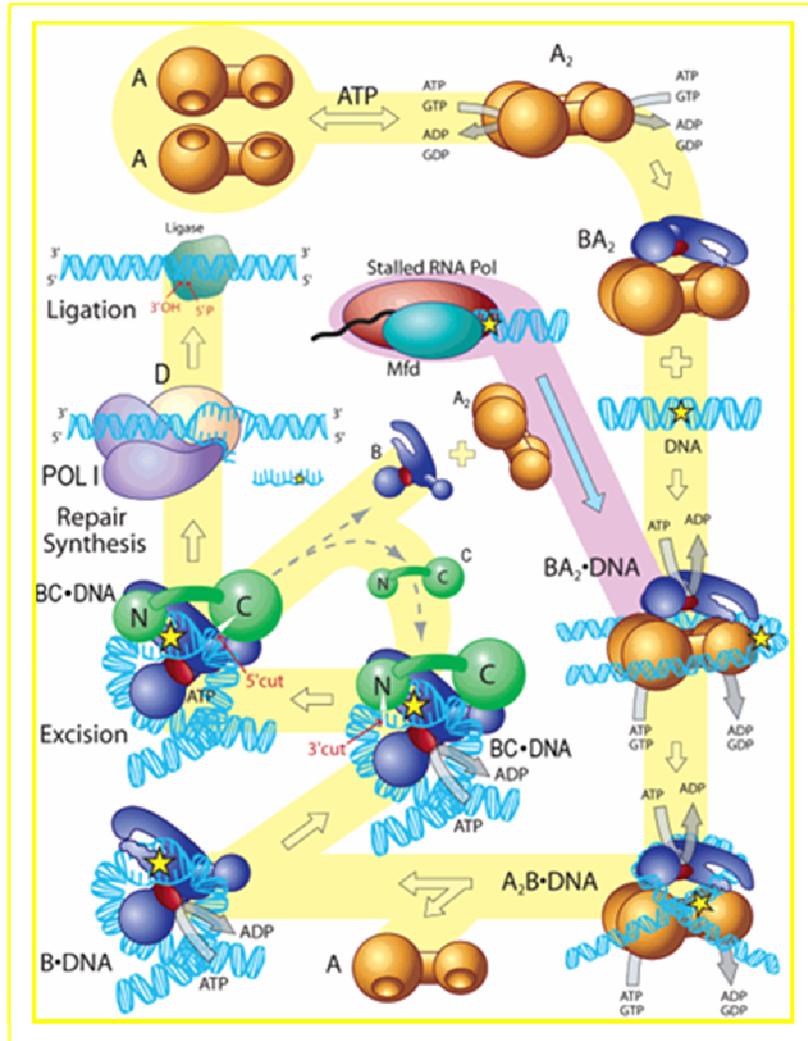


Figura 3: Esquema do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) em *E. coli* (adaptado de Truglio *et al.*, 2006). Reconhecimento e reparo de DNA pelas UvrABC. Na via do reparo global, as formas UvrA e UvrB, dependentes de ATP que diretamente reconhecem o dano no DNA. Na via de reparo por transcrição dupla, Mfd (TRCF) recruta UvrA para o sítio do dano do DNA marcado por uma RNA polimerase. Em ambas as vias, UvrA carrega UvrB para dentro do DNA danificado e subsequentemente dissocia, levando para trás um complexo pré incisional, UvrB:DNA. UvrC se liga ao complexo pré incisional e medeia as incisões em ambos os sítios 3'' e 5'' do DNA. UvrD (DNA helicase II) remove o oligonucleotídeo incisado e a UvrC. A polimerase I enche o espaço vazio e solta a UvrB. O novo fragmento sintetizado é ligado na fita parental pela DNA ligase .

NER: Eucariotos x Bactérias:

O papel do mecanismo NER é bem conservado na natureza, demonstrando analogias no reconhecimento das lesões, incisão, excisão do fragmento e síntese para o reparo no DNA, em eucariotos e bactérias. Enzimas do NER de eucariotos e de bactérias apresentam homologia funcional dentro de cada reino com diferenças em suas sequências quando os organismos são comparados (Bienstock *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003).

2. Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos em eucariotos

A observação de NER em eucariotos ocorreu logo após a descoberta deste mecanismo em *E. coli* por volta de 1960, quando estudou-se uma doença denominada *Xeroderma pigmentosum* (XP), associada a um defeito em NER (Nouspikel, 2009).

O mecanismo de NER em eucariotos pode ser subdividido em: i) Reparo preferencialmente dos genes ativos ou reparo acoplado à transcrição (“transcription-coupled-repair” - TC-NER), ii) Reparo global do genoma (“global genomic repair”- GG-NER), iii) Reparo associado ao domínio transcricional (DAR). DAR mantém um ambiente proficiente de reparo nas células que exibam uma atenuação de GGR (Raams, *et al.*, 2008; Nouspikel, 2009).

Etapas do NER em eucariotos:

Reconhecimento da lesão

Complexo XPC:

Para que NER seja ativado, é necessário que exista modificação estrutural da dupla hélice do DNA. XPC é uma proteína que tem grande afinidade de se ligar ao DNA lesado. Quando XPC chega ao DNA, ela é poliubiquitinada, principalmente em lesões que causam pouca distorção como **CPDs**, facilitando sua interação com histonas acetiltransferases durante o reconhecimento da lesão (Hoogstraten, *et al.*, 2008, Nouspikel, 2009).

Complexo DDB:

Este complexo contém as enzimas DDB1 e DDB2/XPE, apresentando grande afinidade por **6-4PPs e CPDs**. Quando se liga à lesão, forma uma distorção no DNA para recrutar o complexo XPC. Este mecanismo não é tão importante no caso das lesões 6-4 PPS, as quais são rapidamente reconhecidas pelo complexo, mas é crítico para os CPDs. DDB1 apresenta uma afinidade por CSA (enzima requerida para TCR) e DDB2 afinidade para XPC o qual contém a enzima E3 que ubiquitina XPC (Nospikel, 2009).

Abertura da bolha de desnaturação

Complexo TFIIH: Após o reconhecimento da lesão por XPC, o complexo TFIIH é recrutado. Este complexo apresenta 10 subunidades, entre elas as helicases XPB e XPD que apresentam a função adicional de abrir uma bolha de desnaturação ao redor da lesão, além de sua atividade helicase (Gillet, *et al.*, 2006; Nospikel, 2009).

Incisão do DNA**Complexo XPA:**

XPA apresenta afinidade à lesão do DNA. Este complexo é recrutado após o TFIIH, e desliga o complexo XPC e, por segurança, faz um novo reconhecimento da fita que contém a lesão.

Complexo de incisão - A incisão da lesão é feita do lado 3' pela endonuclease XPG que também apresenta a função de estabilizar TFIIH. Sua presença é necessária para o complexo XPF-ERCC1 promover a incisão do lado 5'.

Excisão, ressíntese e ligação do DNA:

Após a incisão, a lacuna é preenchida pelas polimerases delta e epsilon, associadas com a PCNA. Finalmente, a ligação da seqüência recém formada é feita pela ligase III junto com XRCC1 e a ligase I, as quais concluem o processo do reparo.

Para o TCR, a RNA polimerase II (RNAPII) é quem reconhece a lesão. Ela interrompe a transcrição no local contendo a lesão e atrai as enzimas do NER. Assim, TC-NER e GG-NER podem ser conceituados como dois caminhos de NER, sendo diferentes somente na etapa inicial, quando ocorre o reconhecimento da lesão (figura 4) (Friedberg *et al.*, 2006, Nospikel, 2009).

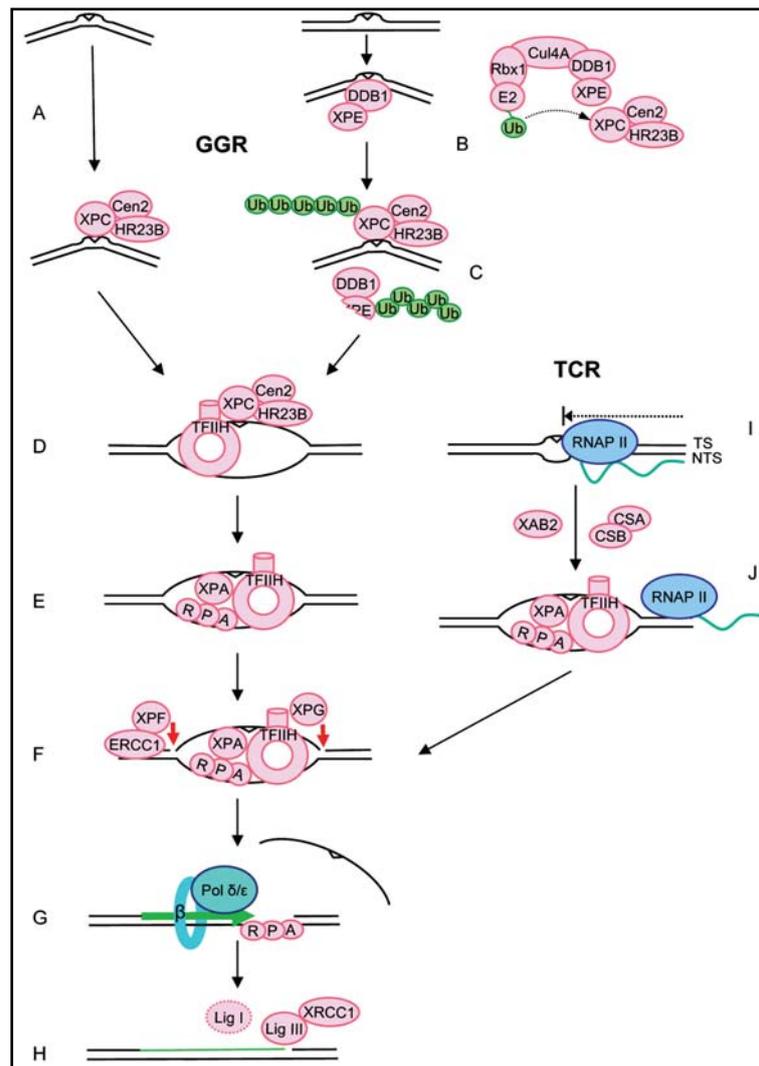


Figura 4: Mecanismo do NER em eucarioto: A) lesões detectadas diretamente pelo complexo XPC-HR23B-Cen2; B) Lesões reconhecidas pelo complexo DDB; C) Ubiquinização de XPC aumenta afinidade para DNA; D) TFIIH abre uma bolha ao redor da lesão; E) o complexo XPA-RPA se liga e desloca o complexo XPC; F) XPG corta a fita lesada no lado 3', ERCC1-XPF no lado 5'; G) oligonucleotídeos são desligados e resultando um sítio AP que é preenchido pela DNA polimerase delta ou épsilon, provavelmente associada com PCNA; H) o pedaço é selado pela ligase III + ligase I; I) TCR – RNA polimerase chega primeiro nas lesões nas fitas transcritas atraindo enzimas NER; J) o produto NER para o GGR, requer enzimas CSA, CSB e XAB2 não necessitando do complexo XPC-DDB (adaptado de, Nouspikel, 2009).

Doenças causadas por deficiência do NER

Xeroderma pigmentosum (XP):

É uma síndrome com herança autossômica recessiva, devido à ausência ou nível reduzido de NER em células humanas, apresentando grande heterogeneidade genética. Os pacientes apresentam elevada sensibilidade à irradiação solar, formação de cânceres de pele e em outros órgãos. Uma fração destes pacientes (18%) apresenta anormalidades neurológicas progressivas (de Boer & Hoeijmakers, 2000), possivelmente associadas à deficiência de reparo de lesões em células nervosas, induzindo morte celular (Reardon *et al.*, 1997). Foram identificados sete grupos de complementação gênica, correspondentes a sete proteínas participantes do NER (XPA até XPG), juntamente com um grupo denominado variante (proteína XPV), que exibe sintomas dermatológicos de XP, mas possuem níveis normais de reparo nas células e não apresentam problemas neurológicos (Friedberg, *et al.*, 2006; Nospikel, 2009).

Síndrome de Cockayne (CS):

É uma síndrome que pode apresentar entre outros sintomas, retardo de crescimento, severos sintomas neurológicos, anormalidades oculares, foto sensibilidade cutânea, sem predisposição ao câncer. Pode ser atribuída a falta de TCR- NER. No entanto, ainda é discutível a razão pela qual alguns pacientes XP, que também apresentam deficiência em TCR, não apresentarem sintomas semelhantes a CS (Friedberg, *et al.*, 2006, www.genoma.ib.usp.br).

Tricotiodistrofia (TTD):

Indivíduos com tricotiodistrofia apresentam deficiência de enxofre nos cabelos e nas unhas, o que resulta em seu estado quebradiço. Além disso, esses pacientes apresentam atraso no crescimento e retardo mental, além de fotossensibilidade cutânea, embora sem predisposição ao câncer. Determinados tipos de mutação em XPB e XPD podem causar a tricotiodistrofia. Essa síndrome pode também ser causada por mutações em outro gene, denominado TTDA (www.genoma.ib.usp.br).

3. Mecanismo de reparo por Excisão de Bases (BER)

O BER é provavelmente o sistema de reparo mais frequentemente utilizado na natureza. Constitui um sistema enzimático que previne lesões oriundas do metabolismo celular, incluindo aquelas que resultam da ação de ERO, metilação, desaminação e hidroxilação. Este mecanismo também protege o DNA contra os efeitos genotóxicos causados por agentes exógenos, como irradiação UV, radiações ionizantes e agentes alquilantes. Este processo de reparo é iniciado com o reconhecimento das bases danificadas, por DNA glicosilases. Tais enzimas possuem conformações específicas em suas estruturas, reconhecendo diferentes tipos de lesões, hidrolisando a ligação N-glicosídica entre o açúcar e a base, criando um sítio abásico apurínico ou apirimidínico (AP). As enzimas com atividade de DNA glicosilase foram inicialmente estudadas em *E. coli*. Atualmente, DNA glicosilases foram caracterizadas em eucariotos, apresentando grande homologia funcional com as enzimas de procariotos (Memisoglu, 2000; Friedberg *et al.*, 2006) (quadros 1 e 2).

Quadro 1: BER- DNA glicosilases em *E. coli* (Adaptado de Friedberg, 2006). Em vermelho, proteínas de interesse para este estudo.

Gene	Proteína (sinônimos)	Nome comum	Exemplos de atividade no DNA	AP liase associada
ung⁺	Ung	DNA- Uracil glicosilase	Remove uracil	Não
mug⁺	Mug	DNA-Mug glicosilase	Remove uracil, timina ou guanina oposta a etenocitosina	Não
<i>fpg⁺</i> (mutM⁺)	Fpg(MutM)	DNA-FaPy glicosilase	Remove purinas oxidadas e anel aberto, incluindo 8-oxoG e formamidopirimidina	Sim
mutY⁺	MutY	DNA-MutY glicosilase	Remove 8-oxoG oposta a adenina	Não
nth⁺	Nth (EndoIII)	Endonuclease III	Remove anel saturado ou pirimidinas fragmentadas	Sim
tagA⁺	TagA	DNA-3-Metiladenina glicosilase I	Remove metiladenina -3 e etiladenina -3	Não
alkA⁺	AlkA	DNA-3-Metiladenina glicosilase II	Remove metilpurinas -3, metilpurinas-7, etilpurina-7, etenoadenina, e metilpirimidinas 0 ²	Não
nei⁺	Nei	Endonuclease VIII	Remove anel saturado ou pirimidinas fragmentadas	Sim

Quadro 2: BER- DNA glicosilases em células humanas (Adaptado de Friedberg, 2006). Em vermelho, proteínas de interesse para este estudo.

Gene	Proteína (sinônimos)	Nome comum	Exemplos de atividade no DNA	AP liase associada
UNG	UNG	DNA- Uracil glicosilase	Remove uracil	Não
SMUG1	SMUG1	DNA SMUGglicosilase	Remove U, 5-hydroximetiluracil	Não
MBD4	MBD4(MED1)	Domínio ligação-metilglicosilase 4	Remove sequencia U ou T opostas G a CpG,O ⁶ - metilguanina oposta a T	Sim
TDG	TDG	DNA-Timina glicosilase	Remove U, T, ou eteno-C oposto a G(sítios CpG)	Não
OGG1	OGG1	DNA-8-OxiG glicosilase	Remove purinas oxidadas e anel aberto, incluindo 8-oxoG e FaPy-G	Sim
MYH	MYH	DNAhomologo MutY glicosilase	Remove A oposta a 8-oxiG, 2-OH oposta a G	Não
NTHL1	NTHL1(NTH1)	Endonuclease III	Remove anel saturado ou pirimidinas fragmentadas	Sim
MPG	MPG(AAG,ANP G,MDG,M1D1)	DNA-Metiladenina- 3 glicosilase I	Remove metilpurina -3 ,hipoxantina, etenoadenina	Não
NEIL1	NEIL1	Endonuclease VIII-like DNA glicosilase 1	Igual a NTHL1 e FaPy-A e 8oxoG	sim
NEIL2	NEIL2	EndonucleaseVIII-like-DNA- glicosilase2	Remove pirimidinas oxidadas ou fragmentadas	Sim
NEIL3	NEIL3	Endonuclease VIII-like DNA- glicosilase	?	sim

Estas enzimas são mono ou bifuncionais por removerem somente a base lesada através de sua atividade glicosilase, ou por também apresentarem uma atividade liase, clivando a porção 3' do DNA do sítio abásico, respectivamente (Friedberg *et al.*, 2006). O sítio abásico pode ser reconhecido pelas AP endonucleases, que hidrolisam a cadeia fosfodiéster do lado 5' deste sítio, ou pelas AP liases que provocam a ruptura da cadeia fosfodiéster do lado 3', através de um mecanismo de β eliminação. *E. coli* apresenta duas AP endonucleases: exonuclease III (*xthA*) e endonuclease IV (*nfo*). A exonuclease III foi inicialmente caracterizada como uma exonuclease com uma atividade associada de fosfatase (Doetsch & Cunningham, 1990). Atualmente, sabe-se que a principal função fisiológica dessa proteína é a atividade de 5' AP endonuclease. Essa enzima é capaz de atuar eficientemente, tanto em sítios apurínicos quanto apirimidínicos (Gossard & Verly, 1978). A endonuclease IV apresenta atividade AP endonuclease semelhante à da exonuclease III (tabela 3).

O resíduo pentafosfato pode ser retirado por uma fosfodiesterase e a lacuna preenchida por polimerização (DNA polimerase I), sendo a união do recém-sintetizado oligo à cadeia feita pela DNA ligase (Schärer, 2003).

Quadro 3: BER- AP endonucleases em *E. coli* e humanos (Friedberg,2006). Em vermelho, genes de interesse para este estudo.

Organismo	Gene	Proteína (sinônimos)	Nome comum	Familia
<i>E. coli</i>	<i>xthA</i> ⁺	XthA (Exo III)	Exonuclease III	XthA
	<i>Nfo</i> ⁺	Nfo (Endo IV)	Endonuclease IV	Nfo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>APN1</i>	Apn1	AP endonuclease I	Nfo
	<i>APN2</i>	Apn2 (Eth1)	AP endonuclease II	XthA
<i>Humano</i>	<i>APEX 1</i>	APEX 1 (APE 1, APEX, HAP1, Ref-1)	AP endonuclease/ exonuclease I	XthA
	<i>APEX 2</i>	APEX 2	AP endonuclease II	XthA

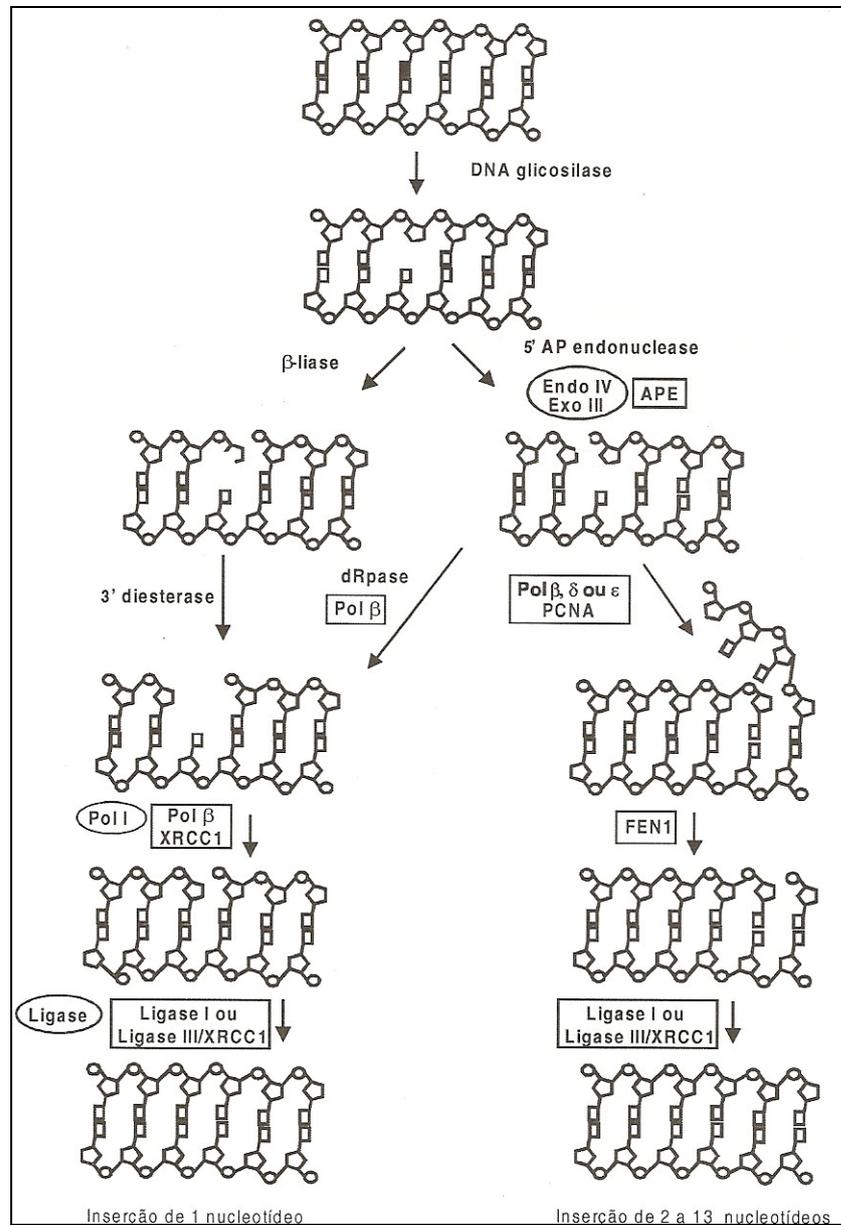


Figura 5: Mecanismos de BER. Em elipses, enzimas bacterianas e em retângulos, enzimas de mamíferos. As demais enzimas representadas são comuns aos dois grupos (adaptado de Ribeiro *et al.*, 2003).

Doenças causadas por deficiência do BER

Al Tassan *et al.* (2002), observaram algumas famílias com manifestações que são compatíveis com polipose adenomatosa familiar clássica, entretanto não foram detectadas mutações no gene *APC* que caracterizaria esta moléstia. Identificaram assim, associação de mutações no gene *MYH* com tumores e múltiplos adenomas colorretais. Mutações nos genes *MYH1* e *OGG1* (BER) estão também associadas com alguns tumores esporádicos de rim e pulmão. O modo de herança do gene *MYH*, é do tipo autossômico recessivo sendo raros fenotipicamente, e é o mais estudado deste conjunto de genes de reparo.

4 - Reparo por Recombinação Homóloga (Homologous Recombination Repair- HRR)

Enquanto os sistemas de reparo acima mencionados estão envolvidos em corrigir modificações específicas do DNA e bases emparelhadas incorretamente, o HRR utiliza moléculas de DNA homólogas, não lesadas, para o reparo de DNA contendo quebras. Quebras duplas (DSB) de DNA podem ser induzidas devido à exposição a fontes exógenas, tal como radiação ionizante ou a agentes endógenos como ERO, ou ainda em processos biológicos naturais como, por exemplo, durante a replicação. Esta cooperação funcional entre recombinação homóloga e maquinaria de replicação permite o sucesso no término da duplicação do genoma e transmissão do material genético para uma célula filha. A recombinação homóloga consiste de três estágios que são comuns para procariotos e eucariotos: **1) pré-sinapse**, onde quebras duplas ocorrem e as terminações geradas são preparadas para a recombinação do DNA; **2) sinapse**, onde conexão física entre o substrato pronto para a recombinação e uma dupla cadeia de DNA homóloga intacto é gerada, levando à formação de moléculas híbridas; e **3) pós-sinapse**, onde há a síntese de DNA a partir do terminal 3', seguida pela resolução das junções intermediárias (Nowosielska, 2007).

Em *E. coli* existem dois mecanismos mais importantes de recombinação homóloga: um dependente de RecB, que se ocupa das DSB, e a via RecF, que repara buracos na fita filha. Ambas necessitam da atividade recombinante de RecA, enzima chave para a HRR. Além da função de recombinação, a proteína RecA também apresenta importância na indução da resposta SOS, (Nowosielska, 2007).

Em eucariotos, a complexidade e significância da recombinação homóloga, em preservar o genoma, podem ser compreendidas através do estudo de doenças humanas

causadas por desordens provenientes de mutações em genes que participam da HRR, tal como: ATM, BRCA, BLM, e WRN. A deficiência da ATM quinase, causa Ataxia Telangiectasia (AT), uma síndrome caracterizada por sensibilidade aumentada à radiação ionizante, degeneração cerebelar, telangiectasia, imunodeficiência, envelhecimento, e aumento do risco de câncer (Nowosielska, 2007). Mutações em BRCA1 e BRCA2 promovem predisposição ao câncer de mama. As proteínas BRCA-1 e BRCA-2 estão envolvidas na reparação de quebras do DNA. Nesse processo, elas interagem principalmente com a proteína RAD51. BRCA2 controla a ligação do DNA à Rad51. Mutações no BRCA2 podem causar anemia de Fanconi (susceptibilidade a leucemia, câncer de ovário, próstata e pâncreas). Defeito no BLM (Bloom syndrome protein) leva à síndrome de Bloom's e no WRN (Werner syndrome protein) à síndrome de Werner (Nowosielska, 2007).

Em eucariotos, o gene Rad51 é homólogo do gene *recA* de bactéria. Em muitos tipos de células, Rad51 interage com P53 e BRCA1 e BRCA2 (supressores tumorais), os quais inibem sua atividade (Dominguez-Bendala *et al.*, 2003). Trojanek *et al.*, (2003) relataram que existe exacerbação ao estímulo de ativação da HRR, com a translocação de Rad51 para o sítio da lesão, logo após ativação do receptor IGF IR, quando ocorre fosforilação de IRS1 (substrato-1 do receptor de insulina). Assim, concluem que, falha nestes dois fatores (ativação do receptor e fosforilação do IRS-1), prejudica o deslocamento de Rad51 para o sítio lesado do DNA. Esta ação envolve uma interação direta de Rad51 com IRS1. Outro mecanismo de modulação de HRR pode ser exercido pela ação de uma proteína, a XPD, pertencente ao NER (Aloyz *et al.*, 2002).

5 - Regulação da resposta SOS:

Muitas respostas para o dano do DNA em *E. coli* são controladas pelo sistema SOS. A expressão de mais de 40 genes deste sistema (ex: *lexA*, *uvrA* e *uvrB*) é induzida por lesões no DNA, sendo regulada pelas proteínas LexA e RecA. A expressão aumentada destes genes SOS resulta em respostas fisiológicas que tem sido denominadas de 'respostas SOS' (Radman, 1975). Em células não contendo lesões no DNA, a LexA age como repressora dos genes, ligando-se a "sítios" específicos (regiões promotoras). Uma vez ocorrendo um sinal indutor, possivelmente trechos de fita simples de DNA (resultantes da presença de uma lesão, da tentativa de correção desta ou de parada da forquilha de replicação), a proteína RecA interage com ela, em presença de ATP, tornando-se "ativada" (RecA*). Nesta forma, a proteína RecA* se liga ao repressor LexA, promovendo a

auto-clivagem deste, fazendo com que haja a desrepressão dos genes por ele controlados, os genes SOS. A medida que os danos no DNA são reparados, o nível do sinal indutor diminui, acarretando a diminuição da conversão da proteína RecA em RecA*. Há, desta forma, o acúmulo do repressor LexA na célula, reiniciando a repressão dos genes SOS (Friedberg *et al.*, 2006).

V. DM e sistema de reparo

O Diabetes Mellitus, uma doença metabólica que apresenta etiologias diversas, é caracterizada por hiperglicemia que resulta de uma deficiência total ou parcial de secreção de insulina pelo pâncreas. É classificada, de acordo com sua etiologia, em: 1) Diabetes Mellitus do tipo 1, caracterizada por deficiência absoluta na produção de insulina, decorrente na maioria dos casos de uma destruição auto-imune das células β ; 2) Diabetes Mellitus do tipo 2, caracterizada por deficiência parcial de secreção de insulina pelo pâncreas, resistência periférica à ação da insulina e aumento da produção de glicose hepática, 3) Outros tipos específicos de diabetes; 4) diabetes gestacional (Oliveira & Milech, 2004). DM2 pode estar associado, não somente, com o elevado nível de danos oxidativos ao DNA (Perfetti & Aggarwal, 1999; Blasiak *et al.*, 2004; Lodovici *et al.*, 2007), mas também com a susceptibilidade aumentada para mutações e diminuição da eficácia do reparo de DNA (Blasiak *et al.*, 2004). Perfetti & Aggarwal (1999), demonstraram que um dos mecanismos que regula a expressão da enzima de reparo XPD é a ativação dos receptores de insulina, assim sendo, a própria insulina é capaz de estimular XPD e esta estimulação seria glicose-dependente. Por outro lado, também é conhecido que a exposição prolongada a níveis elevados de glicose diminui esta capacidade da insulina estimular XPD (Merkel *et al.*, 2003).

VI. DM e câncer

DM está associado com danos em diversas estruturas do organismo, como o DNA, o que se tornou mais freqüente com o prolongamento da vida destes doentes, após a introdução da insulina. Vários autores relatam uma maior incidência de câncer com origens variadas no DM (quadro 4).

Quadro 4: Associação entre DM e câncer. Estudos que demonstram associação entre DM com diversos tipos de cânceres

Autor	Tipo de câncer
La Vecchia <i>et al.</i> , 1994	fígado, endométrio e pâncreas
Czyzyk & Szczepanik , 2000	endométrio, mama e rim
Zendejdel <i>et al.</i> , 2003	estômago e endométrio
Zivalievic <i>et al.</i> , 2004	tireóide
Larsson <i>et al.</i> , 2005	cólon retal
Ren <i>et al.</i> , 2009	
Larsson <i>et al.</i> , 2006	bexiga
Larsson <i>et al.</i> , 2007	mama
Khan <i>et al.</i> 2006	fígado
Friberg <i>et al.</i> 2007	endométrio
Washio <i>et al.</i> , 2007	rim
Sakano K. <i>et al.</i> , 2007	tireóide
Giovannucci & Michaud, 2007	pâncreas
Ogunleye AA, <i>et al.</i> , 2009	Pâncreas, fígado e cólon

Pelo exposto, torna-se importante saber, como o DM influencia a expressão de fatores de crescimento nestes tumores. Uma possível explicação, segundo os autores citados, seria de um potencial efeito da insulina, a hiperinsulinemia, poderia estar agindo em receptores de IGF-1, aumentando substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Isto seria um sinalizador para o subsequente crescimento celular, apresentando um efeito mitogênico. Outra hipótese seria a do estresse oxidativo, levando ambos, ao dano do DNA e limitação da capacidade de reparo, tanto por exaustão quanto pela degradação de proteínas que atuam nestes sistemas. Concluímos assim, que mais estudos são necessários para se esclarecer o porquê deste risco aumentado de câncer em pacientes portadores de DM, para melhor atuarmos na prevenção ou na melhora do prognóstico para estes indivíduos.

VII. Cloridrato de Metformina

A Metformina (MET) faz parte de um grupo farmacológico dito dos sensibilizadores de insulina, as biguanidas, isto é, não são capazes de estimular a secreção de insulina, agem em tecidos periféricos tendo como ação principal melhorar a resistência insulínica. As Biguanidas foram inicialmente empregadas para o tratamento do DM2 baseado no efeito hipoglicemiante da guanidina, uma droga que se mostrou hepatotóxica. A separação do efeito hepatotóxico do anti-hiperglicemiante resultou na síntese das biguanidas: fenformina e MET. Devido à possibilidade de precipitar a acidose láctica, a fenformina foi retirada do mercado. A MET difere da fenformina em alguns aspectos que diminuem muito a chance de acidose láctica (Cusi & De Fronzo, 1998, Roos *e cols.*, 2009).

Perfil farmacocinético e farmacodinâmico:

A MET é incompletamente e lentamente absorvida pelo segmento superior do intestino delgado. Sua meia-vida varia de 4 a 8 horas e seu pico de concentração plasmática é atingido entre 1 e 2 horas após uma dose de 500mg a 1000mg. Ela é rapidamente distribuída e não se liga a proteínas plasmáticas. A eliminação é predominantemente renal, sem metabolização, através de secreção tubular proximal (90% dentro de 12 horas), mas 20 a 30% da excreção podem ser realizadas pelas fezes. Estudos indicam um efeito máximo nas dosagens de 17,5 a 2 gramas por dia (Garber, 1997; Oliveira & Milech, 2004; Erika *e cols.*, 2006).

Mecanismo de ação:

A MET está indicada no tratamento do DM2 e ajuda na prevenção ou posterga a instalação clínica do diabetes. A MET melhora a ação da insulina, aumentando o transporte de glicose, síntese de glicogênio e lipídeo (Gunton *et al.*, 2003). Mesmo na ausência de insulina, melhora o transporte de glicose e a atividade da tirosina quinase do receptor do fator de crescimento 1 semelhante a insulina (IGF-1R) (Kirpichnikov *et al.*, 2002). Por ter ações independentes da insulina, a MET pode ser um coadjuvante à terapia insulínica, no tratamento do DM1 onde ocorre uma redução da necessidade de insulina diária (Meyer *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2003; Meyer & Guerci, 2003; Sarnblad *et al.*, 2003).

A MET apresenta efeitos na produção e distribuição de glicose, perfusão tecidual, metabolismo lipídico, perda de peso e, possivelmente, na secreção insulínica. Por estas ações, ela é considerada ser um agente mais antihiper-glicêmico que hipoglicêmico (Radziuk *et al.*, 2003).

O efeito da MET em baixar a glicemia no DM2 é principalmente uma conseqüência da redução da gliconeogênese hepática, da glicogenólise, e estimulação da entrada de glicose no músculo e adipócitos. Aumenta a expressão dos transportadores de glicose e glicólise nos tecidos periféricos, explicando seu efeito de sensibilização insulínica (Owen *et al.*, 2000, Kirpichnikov *et al.*, 2002, Roos *e col.*, 2009). Melhora a lipemia sistêmica, diminui circulação e oxidação de AGLs (Radziuk *et al.*, 2003, Sekiva *et al.*, 2007; Roos *e col.*, 2009). Um mecanismo para explicar um número de ações da MET tem sido proposto, baseado na ativação da AMPK (Guigas *et al.*, 2004; Detaille *et al.*, 2005; Ouslimani, *et al.*, 2005) onde está sua maior ação.

A MET atinge altas concentrações no intestino delgado e diminui a absorção de glicose intestinal, (Kirpichnikov, 2002). Aumenta as concentrações de Glucagon-like peptide GLP-1 em pacientes DM2 obesos por inibir eficientemente a atividade da DPP IV (Mannucci *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 2005).

Metformina e câncer:

Vários autores estão associando o uso da MET em pacientes portadores de DM, a uma diminuição no risco do desenvolvimento de câncer e a um melhor prognóstico do câncer no decorrer do tratamento em pacientes em uso da MET. =Abaixo segue uma lista de autores que pesquisaram sobre a relação de MET e câncer e seus principais achados:

- Evans *et al.*, (2005): em um estudo observacional, sugeriram uma diminuição no risco de vários cânceres nestes pacientes;
- Anisimov *et al.*, (2005): observaram em glândulas mamárias tumorais de animais transgênicos, tratados com MET, o aparecimento de linfócitos citotóxicos que podem estar relacionados com efeito anti tumoral;
- Hardie (2007): propõe o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo a AMPK (‘chave do metabolismo’) no tratamento do câncer e cita, também, a ocorrência de menos câncer em pacientes diabéticos tratados com MET;
- Buzzai *et al.*, (2007): utilizando linhagem de células de câncer de cólon, MET foi seletivamente tóxica para as células deficientes em p53;
- Aleisa *et al.*, (2007): diminuição de mutagenicidade, da clastogenicidade, e da peroxidação lipídica induzidas por adriamicina, uma droga citotóxica;
- Zakikhani *et al.*, (2006): propõem a ativação da via AMPK pela MET, como possível mecanismo de ação para a inibição do crescimento de células de câncer de mama;

- Kisfalvi *et al.*, (2009): relatam da possibilidade da MET ser um coadjuvante no tratamento do câncer de pâncreas.
- Wright & Stanford (2009): menor risco do câncer de próstata;
- Jiralerspong *et al.*, (2009): melhor prognóstico para certos tipos de câncer como por exemplo o câncer de mama;
- Schneider *et al.*, (2001): em ratos, MET preveniu o câncer pancreático;
- Duncan & Schmidt (2009): Relatam que MET não somente exerce um efeito importante de proteção contra o desenvolvimento de vários cânceres, mas também melhora prognóstico dos mesmos.

Os autores acima propõem que, a ação da MET em diminuir o risco de cânceres poderia ser devida sua ação em AMPK. Outros relatam que seria devida sua ação antioxidante (Khouri *et al.*, 2004). Mas, Kirpichnikov *et al.*, 2002 demonstram que a MET não é um bom sequestrador de ERO, *in vitro*, já que não foi capaz de sequestrar os radicais $O_2^{\bullet-}$.

Esses achados demonstram uma importante associação entre o uso da MET e a prevenção contra diferentes tipos de cânceres, cujo mecanismo molecular ainda não está totalmente esclarecido. Neste sentido, torna-se importante verificar uma possível ação da MET sobre o funcionamento de mecanismos de reparo de DNA. Isto ainda é mais importante, se lembrarmos que em humanos, a MET atua em receptores de insulina e que estes, em suas cascatas de ativação, envolvem proteínas atuantes em alguns sistemas de reparo como é o caso da proteína XPD, pertencente ao NER e Rad51, pertencente a HRR. Assim resolvemos testar a ação desta droga, sobre a atividade de reparo NER, em células eucarióticas e em diferentes sistemas de reparo, em procariotos, quando tratados com um agente que promove lesões no DNA, o UVC.

1. Objetivo Geral

Estudar a ação da metformina (MET) em sistemas de reparo de DNA em procariotos e eucariotos.

2. Objetivos Específicos

A. Em procariotos:

Em cepas de bactérias deficientes, ou não, em enzimas de reparo de DNA:

- Determinação da concentração de MET a ser utilizada nos experimentos, já que não existe descrito na literatura experimentos de MET em bactérias;
- Avaliar as cinéticas de inativação em presença da MET, com posterior irradiação com UVC;
- Avaliar a cinética de inativação, antes e após a complementação fenotípica em bactérias mutantes;
- Avaliar se a MET induz o sistema SOS de reparo, utilizando a Técnica do SOS Cromoteste;
- Avaliar se a MET induz reparo, através da Técnica de Eletroforese Alcalina em Gel de Agarose.

B. Em eucariotos:

Em células (fibroblastos) de pacientes portadores da síndrome *xeroderma pigmentosum* (XP), deficientes na enzima XPD de reparo de DNA e em células MRC5, de pacientes sadios:

- Avaliar a cinética de inativação destas células pré-tratadas, ou não, com MET e após irradiadas, ou não, com UVC, através da metodologia do Azul de Trypan;
- Avaliar a cinética de inativação, nas mesmas condições acima, na presença, ou não, de insulina.

Em células da linhagem celular MCF7, derivada de adenocarcinoma mamário, transfectada com plasmídeo recombinante contendo a região promotora do gene *BRCA1* e o gene codificante da proteína luciferase:

- Avaliar a expressão do gene BRCA1 pelo tratamento destas células MET e insulina, através do ensaio Luciferase.

Material e Métodos

I. Experimentos de Sobrevivência com bactérias

1. Conservação das Cepas Bacterianas:

Os estoques das cepas bacterianas eram preparados, utilizando-se volumes iguais (2,5 mL) de cultura, em fase estacionária de crescimento e glicerol estéril. Tais estoques eram acondicionados em tubos de vidro com rosca e armazenados a -20°C , sendo renovados a cada 4 meses (Quadro 5).

Quadro 5: Cepas Bacterianas utilizados no estudo

Cepa	Característica relevante para este estudo	Procedência
AB1157	Selvagem (proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA)	Deste laboratório
AB1884	<i>uvrC</i> (deficiente no gene <i>uvrC</i> NER)	Deste laboratório
AB1885	<i>uvrB</i> (deficiente no gene <i>uvrB</i> NER)	Deste laboratório
AB1886	<i>uvrA</i> (deficiente no gene <i>uvrA</i> NER)	Deste laboratório
BW9091	<i>xthA</i> (deficiente no gene <i>xthA</i> BER)	Deste laboratório
BW527	<i>nfo</i> (deficiente no gene <i>nfo</i> BER)	Deste laboratório
BH20	<i>fpg</i> (deficiente no gene <i>fpg</i> – BER)	Deste laboratório
GY4763	<i>recA</i> 142 (SOS ⁺ <i>recA</i> ⁻)	Deste laboratório
AB2463	<i>recA</i> (SOS ⁻ <i>recA</i> ⁻)	Deste laboratório
AB1885 pNP12	Transformada (proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA)	Este trabalho
BH20 pFPG	Transformada (proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA)	Este trabalho
BW527 pBW21	Transformada (proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA)	Este trabalho

Quadro 6: Plasmídeos utilizados no estudo

Plasmídeos	Genotipo conferido	Origem
pNP12	<i>uvrB</i> (canamicina 40 µg/ml)	N. Goosen
pFPG	<i>fpg</i> (ampicilina 50 µg/ml)	P. Radicella
pBW21	<i>nfo</i> (estreptomicina 100 µg/ml)	Bernard Weiss

2. Cultura de Bactérias

Quadro 7: Composição dos meios de cultura e soluções utilizadas no estudo com bactérias

Soluções / Meios	Composição/Concentração	Procedência
Meio LB líquido	Extrato de levedura / 0,45% Bacto-triptona / 0,9% NaCl / 0,9% pH 7,0	DIFCO ACUMEDIA LAFAN
Meio LB gelificado	Meio LB líquido Ágar-ágar / 1,5%	DIFCO
Salina	NaCl / 0,9%	LAFAN

3. Obtenção das Culturas Bacterianas

Uma alíquota (100 μ L) do estoque bacteriano, de cada cepa em glicerol, era colocada em um erlenmeyer estéril (50 mL), contendo 10 mL de meio LB. Incubava-se a 37°C, sob agitação constante (120 rpm), por 15 a 18 horas (tempo para a cultura atingir a fase estacionária de crescimento – 10^9 células/mL). Uma alíquota desta cultura era misturada com meio LB, na proporção de 2:100 e incubada a 37°C, sob agitação constante (120 rpm), até atingir a fase exponencial de crescimento ($1-2 \times 10^8$ células/mL), $A= 0,1$, conforme verificado por leitura em espectrofotômetro, a 600 nm. As culturas, assim obtidas, eram centrifugadas (15 minutos; 2.940 xg; 4°C), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuspensão em solução salina. Repetia-se o processo para a total eliminação do meio de crescimento.

4. Avaliação da absorvância da MET ao UVC

Uma solução de MET, em água destilada, (20mg/ml), foi colocada em cubeta de quartzo para leitura da absorvância em espectrofotômetro, na faixa entre 200 e 400 nm. Essas leituras foram feitas sempre contra um branco, contendo apenas água destilada, lançando-se em gráfico de dispersão, os valores de absorvâncias nas ordenadas e os respectivos comprimentos de onda, nas abscissas.

5. Tratamento da cepa AB1157 com diversas doses de Metformina

A Metformina foi, gentilmente, fornecida pela MERCK Brasil.

Após a obtenção da cultura bacteriana, conforme descrito acima (item 3) retirava-se uma alíquota (mL) à qual se adicionava a MET, em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 40, 50 e 100 mg/ml), obtidas por diluição de uma solução mãe em H₂O destilada, com o objetivo de se determinar uma dose próxima à subletal a ser utilizada nos experimentos. Logo em seguida, deixava-se a cultura tratada sob agitação (120 rpm), a 37°C, durante 60 min, retirando-se, a cada 20 min, alíquotas (50 μ L) para diluição e posterior semeadura com 20

gotas de 10 μ L cada uma, em cada placa de diluição que continha LB gelificado. Em seguida, as placas eram invertidas e colocadas em estufa, a 37°, durante, pelo menos 12 horas, para após serem contadas as unidades formadoras de colônias.

6. Tratamento de cepas bacterianas com Metformina

1° experimento

Após a determinação experimental da dose de MET (20 mg/ml= 168mM), conforme verificado no item anterior, tratou-se as cepas bacterianas relacionadas no quadro 2, para se observar a ação da droga nesses microorganismos. Para tanto, duas alíquotas (1mL) de cada cultura eram retiradas. Uma para controle, onde adicionava-se 1mL de salina; e a outra, para o tratamento com MET, onde adicionava-se 200 μ L de salina e 800 μ L de MET (concentração final de 20 mg/ml no tubo) procedendo-se após, conforme descrito acima, à incubação por 60 minutos, diluição e ao posterior semeadura.

2° experimento

Preparação das cepas relacionadas no quadro 2 para a irradiação com UVC:

Repetiu-se o tratamento descrito acima para o 1° experimento, mas aos 40 minutos de incubação com a MET, duas alíquotas (1mL) de cada amostra foram retiradas (controle e tratamento) e colocadas em tubos de microcentrífuga, para centrifugação a 12000 xg, durante 60 segundos. O sobrenadante era desprezado e o precipitado ressuspenso em salina (1mL), repetindo-se o procedimento de centrifugação, para se garantir a retirada da MET, pois conforme verificado, através da realização de um espectro de absorção (item B), a droga absorve na faixa do UVC.

Após as duas alíquotas terem sido centrifugadas e devidamente lavadas, foram irradiadas em placa de Petri, destampada, no volume de 1000 μ l. A irradiação foi feita com lâmpada germicida de 15W, (General Eletric G15T8, EUA) com mais de 95% das emissões em 254 nm, de modo a se obter morte bacteriana, próxima à DL10 de cada cepa (ver Quadro 8). A dosimetria foi realizada com dosímetro Vilbert-Lourmat Radiomètre (VLX-254, Marne-

La-Vallée- France). Após cada irradiação eram retiradas alíquotas, para posterior semeadura e contagem de colônias.

Quadro 8: Doses de irradiação UVC utilizadas nas diferentes cepas bacterianas

Cepa	Doses de UVC J/m²/s
AB1157	35 -70 - 105
AB1884	1,5 - 3,0 - 4,5
AB1885	1,5 - 3,0 - 4,5
AB1886	1,5 - 3,0 - 4,5
BW9091	15 - 30 - 45
BW527	20 - 40 - 60
BH20	20 - 40 - 60
GY4763	1,5 - 3,0 - 4,5
AB2463	0,5 -1,0 -2,0
AB1885 pNP12	35 - 70 - 105
BH20 pFPG	35 -70 -105
BW527pBW21	35 - 70 - 105

7. Transformação das cepas bacterianas:

Os mutantes AB1885pNP12; BH20pFPG; e Bw527pBW21 foram obtidos pela transformação das cepas AB1885, BH20 e BW527 com plasmídeos, pNP12(*uvrB*⁺), pFPG (*fpg*⁺) e pBW21 (*nfo*⁺) respectivamente, segundo metodologia descrita no item abaixo.

Preparação das células competentes:

Culturas bacterianas em fase exponencial de crescimento, obtidas conforme descrito (item A), eram colocadas em tubos de centrifuga, previamente resfriados e acondicionados em gelo. Em seguida, centrifugava-se a 2940xg, por 10min, a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o precipitado em 10 mL de CaCl₂ 100 mM, para permeabilizar a parede celular, mantendo-se no gelo por mais 30 min. Em seguida, centrifugava-se por 10 min a 2940xg e 4°C. O sobrenadante era desprezado e o precipitado ressuspensado em 2 ml de CaCl₂ 100 mM. Os tubos eram colocados em isopor, com gelo e, na geladeira, por mais 24 horas. Assim, as cepas se tornaram competentes.

Transformação:

Adicionava-se 5µL de plasmídeos (5ng) a 100µL de bactéria competente em tubo de micocentrífuga e mantinha-se, por 20 min, no gelo. Logo após, transferia-se para banho-maria a 42°C permanecendo, assim, por 4 min. Em seguida, retornava-se para o gelo, por 2 min e, então, adicionava-se 500µL de LB e incubava-se a 37°C, sob agitação, por 1 h. Espalhava-se 20 gotas de 10 µL em placas contendo LB com antibiótico referente à resistência conferida pelo plasmídeo, gelificado, para ratificar a validação da transformação. Após este procedimento, foi feita a obtenção de culturas para experimentos. Seguiu-se o tratamento de cada uma das cepas transformadas (conforme já descrito acima) com MET e as suas irradiações com a dose de UVC equivalente àquela da cepa selvagem (70J/m²), já que esperávamos que elas se tornassem proficientes em todas as enzimas de reparo.

8. Determinação das frações de sobrevivência das cepas bacterianas e análise estatística

Em todos os experimentos, após os espalhamentos e contagem das colônias, foram determinadas as frações de sobrevivência (FS). As FS (N/N_0) eram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis, após cada tempo de tratamento (N), pelo número de células viáveis no tempo zero de incubação (N_0). As curvas obtidas nesses experimentos foram analisadas através do programa estatístico GraphPad Prism, versão 4.0, utilizando-se a técnica ANOVA seguida do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N_0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

9. Avaliação do reparo do DNA , induzido pela MET, através da Técnica de Eletroforese Alcalina em Gel de Agarose

Quadro 9: Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas para a técnica de Eletroforese Alcalina em Gel de Agarose

Soluções	Composição	Procedência
TE	Tris-Cl 50mM pH 8,0- 10mL EDTA 5 mM pH8,0- 2mL H ₂ O destilada- 188mL	Gibco-BRL Vetec
Tampão de corrida	NaOH 0,03 mM- 1,5 mL EDTA 0,01mM pH8,0- 10mL H ₂ O destilada- 488,50mL pH13	Vetec Vetec
Solução de Neutralização	NaCl 30mM - 7,5mL-15ml ou 7,7 Tris Cl 50mM pH6.0 - 25mL ou 12,5mL H ₂ O destilada- 460mL ou 230mL	Vetec
Agarose <i>Low melting point</i> 1,5%	Agarose LMP- 0,015g TE- 1mL	Gibco-BRL

Agarose <i>normal melting point</i> 0,76%	Agarose NMP- 0,19g Tampão de corrida- 25mL	Gibco-BRL
Solução de lise	EDTA 0,1mM pH8,0- 10 μ L SDS 0,05%- 50 μ L NaOH 0,05M- 500 μ L H ₂ O destilada- 9,440 μ L	Gibco- BRL
Brometo de etídio	0,5 μ g / mL H ₂ O destilada	Gibco-BRL

Técnica da Eletroforese Alcalina de DNA genômico bacteriano em Gel de Agarose (De Mattos *et al.*, 2008):

Obtinha-se uma cultura em fase exponencial de crescimento conforme descrito no item I. 3. Duas amostras contendo 14 mL, cada, eram retiradas, uma para controle (adicionando 11,2 mL de salina) e uma para tratamento (adicionando 11,2 mL MET- concentração final de 20 mg/mL) em erlenmeyer. As amostras eram mantidas sob agitação por 40 min e, em seguida, centrifugadas (15 min, 2940xg, 4°C), resuspensas em salina e divididas em 2 frações de 7 mL cada para serem irradiadas com UVC (70J/m²). Ao final tinha-se 4 amostras (controle, metformina 20 mg/ml, UVC 70J/m² e tratada com MET + UVC). Alíquotas (1,5 mL) de cada um dos tratamentos eram retiradas para serem centrifugadas (1 min; 12000xg) e ressuspensas em 10 µL de TE para preparação dos blocos em agarose LMP. As frações restantes foram centrifugadas (15 min, 2940xg, 4°C), ressuspensas em LB e mantidas sob agitação durante 90 min, sendo retirados 1,5 mL a cada 30 min, para preparação dos blocos. Os blocos eram preparados, acrescentando-se 50 µL de agarose LMP aos 10 µL, sendo a mistura (60 µL) aplicada em poços pequenos, para gelificar. Os blocos eram mergulhados em solução de lise (1 mL) e incubados por 30 min no escuro. A solução de lise era retirada, e os blocos lavados 3x em TE gelado, secados com papel e colocados nos pentes da cuba de eletroforese (minigel) para formar os *slots* do gel de agarose. O gel era submetido à eletroforese (7 V durante 14 hs). Ao final, o gel era neutralizado por 1 hora, corado com brometo de etídeo e a imagem digitalizada.

Análise estatística referente à imagem digitalizada:

Análise estatística foi feita através do teste qui-quadrado, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism, versão 4.0.

10. Avaliação da indução do sistema SOS pela MET, através da Técnica do SOS Cromoteste
 (Quillardet P & Hofnung M., 1985)

Quadro 10 : Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas na Técnica do SOS Cromoteste

Soluções	Composição	Procedência
ONPG	ONPG – 4 mg Tampão Fosfato- 1 mL	SIGMA
PNPP	PNPP – 4 mg Tampão Fosfato- 1 mL	SIGMA
Tampão Fosfato pH 7	Na ₂ HPO ₄ – 1,64g/ 61mL H ₂ O NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (0,1M)- 0,54g/39mL H ₂ O	ISOFAR
Tampão B	Na ₂ HPO ₄ . 16,1g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O – 5,5g KCl- 0,75g MgSO ₄ . 7 H ₂ O – 0,25g SDS- 1,0g β mercaptoetanol – 2,7mL H ₂ O – 1000mL	ISOFAR
Tampão P	TRIS – 121,0 g SDS – 1,0g H ₂ O – 1000mL	AMRESCO
Carbonato de Sódio	Na ₂ CO ₃ 1M – 106,0g H ₂ O – 1000mL	REAGEN

HCL 2,5M	HCL – 1,82mL H ₂ O – 18,18mL	ISO FAR
TRIS 2M	TRIS – 242g H ₂ O – 1000mL pH 6.0	AM RESCO
Meio M9S	KH ₂ PO ₄ / 0,3% NaCl / 0,05% NH ₄ Cl / 0,1% Na ₂ HPO ₄ / 0,6% Glicose / 400 mg/mL MgSO ₄ / 24,6 mg/mL Casaminoácidos / 250 mg/mL CaCl ₂ / 1,47 µg/mL Tiamina / 1 mg/mL H ₂ O destilada	VETEC ISO FAR VETEC ISO FAR VETEC ISO FAR ISO FAR

O SOS cromoteste é um ensaio colorimétrico onde se mede o aumento dos níveis da enzima β -galactosidase conforme a indução da resposta SOS em decorrência de danos na molécula de DNA (Quillardet & Hofnung, 1985). Assim, era feito o pernoite e repique de uma cultura da cepa bacteriana *E. coli* PQ35 (cepa bacteriana contendo uma fusão do promotor de um gene SOS com o estrutural do operon *lacZ: sfiA::lacZ*), conforme já descrito acima. A seguir, dividia-se a cultura em 3 grupos de 1 ml cada: Controle, UVC (40J/m², - controle positivo), MET 20 mg/ml e MET 20 mg + UVC, e incubava-se durante 40 min, a 37°C. Após este período, seguia-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante para posterior ressuspensão em 1 mL de meio M9S e incubava-se por 1:30h a 37°C para que ocorresse a síntese de proteínas. Cada fração foi separada em duas séries, X e Y:

Série X (β - Galactosidase): eram retirados 300 µL da cultura e adicionados a 2,7 mL de tampão B. Incubava-se durante 10 min a 37°C, adicionando-se logo após, 0,6 mL de solução

de ONPG deixando reagir por 10 a 90 min, 37°C, parando a reação com 2 mL de Na₂CO₃, lendo-se a DO a seguir em 420 nm.

Série Y: (Fosfatase Alcalina):

Mesmo procedimento anterior, juntando-se 2,7mL de tampão P ao invés de B. Incubava-se a 37°C durante 10 min, adicionando-se logo após, 0,6 mL de PNPP, deixando reagir por 10 a 90 min a 37°C, parando a reação com 1 mL de TRIS. Após 5 min, acrescentava-se 1 mL de HCL 2,5 M e em seguida, lia-se a DO em 420 nm.

Avaliação da análise estatística:

Foram calculadas as médias dos dois experimentos realizados. Como em cada um deles só foi realizada uma determinação, isto não permitiu a análise estatística destes resultados.

II. Culturas de Células Humanas

1. Composição dos meios de cultura e das soluções empregadas neste estudo (quadro 11)

Quadro 11: Meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos com células eucarióticas

Soluções/Meios	Procedência
DMEM	Gibco BRL
Soro Fetal Bovino (10%)	Gibco BRL
Penicilina (100 U/ml)/Estreptomicina (100µg/ml)	Gibco BRL
Tripsina/EDTA	Gibco BRL
Azul de Trypan	Gibco BRL

Obs: O meio (DEMEM + soro fetal), a tripsina e a salina devem estar a 37°C quando forem utilizados e devem ser armazenados em geladeira.

Material necessário:

Garrafas pequenas de 25 cm², médias de 75 cm² e grandes de 150 cm²

Pipetas estéreis

2. Linhagens de Células:

Neste trabalho foram utilizadas culturas de fibroblastos humanos provenientes de biópsias de pele não exposta ao sol:

MRC5: Cultura transformada pelo vírus SV40 obtida a partir de fibroblastos de indivíduo normal.

XP6BE (XPD): Cultura transformada pelo vírus SV40 obtida a partir de fibroblastos de paciente portador da Síndrome *Xeroderma Pigmentosum* do grupo D de complementação.

Estas linhagens foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Linhagem celular MCF7: derivada de adenocarcinoma mamário, transfectadas com plasmídeo recombinante contendo o promotor do gene *BRCA1* localizado anteriormente ao gene *LUC+*

que codifica a proteína luciferase, utilizada como “*reporter*”. A região promotora de *BRCA1* foi obtida através de reação de amplificação em cadeia (PCR) inserida no sítio de restrição do vetor pGL3-basic para a construção do plasmídeo recombinante. A amplificação foi feita a partir de DNA extraído de pacientes participantes do Programa de Aconselhamento Genético em Câncer de Mama e/ou Ovário do INCA. Esta linhagem foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira do Departamento de Genética do INCA.

3. Cultura de Células As culturas de XPD e MRC5 foram estabelecidas ou imortalizadas pela transformação com o vírus SV40. As células foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (meio completo) e 1% de antibióticos, penicilina e estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ e com 95% de umidade. As culturas em monocamadas de fibroblastos eram repicadas de 4 em 4 dias na proporção de 1:10.

4. Subcultivo de Células: Examinava-se a cultura ao microscópio óptico invertido com contraste de fase para se observar o aspecto geral e a confluência da cultura. Células das duas linhagens utilizadas eram subcultivadas retirando-se o meio, lavando-as com salina e tratando-as com Tripsina/EDTA: 0,5 ml para a garrafa pequena, 1 ml garrafa média e 1,5 ml. garrafa grande. Logo após, incubava-se a cultura em estufa (conforme item 3), por 1 a 2 minutos e ao retirá-las davam-se umas batidas na garrafa para ajudar a soltar as células e observava-se rapidamente ao microscópio invertido se as células estavam arredondadas e soltas da superfície da garrafa. Se as células não estivessem se soltando, colocava-se novamente em estufa durante 1 a 2 minutos. Nestas condições ocorre a degradação da matriz protéica responsável pela aderência das células na garrafa de cultura. Sendo o repique de manutenção (1/10), adicionava-se 9 ml de meio completo para neutralização da tripsina e logo após as células eram ressuspensas através de fluxo-refluxo. Esta suspensão de células era diluída em novas garrafas de cultura na proporção de 1/10 ml, ou conforme a necessidade para experimentos seguintes, e depois era adicionado meio completo de acordo com o volume necessário para cada tamanho de garrafa: 5ml (25cm²); 12ml (75 cm²) e 35 ml (150 cm²). Quando utilizavam-se as células para experimentos, depois de adicionado os 9 ml de meio e feito o fluxo-refluxo, contava-se em câmara de Neubauer com auxílio do azul de Trypan para serem diluídas conforme o número de células necessárias. Para experimentos, as células

deveriam estar em fase logarítmica de crescimento, ou seja, em torno de 75 a 80% de confluência, observadas ao microscópio, quando ainda aderidas na garrafa.

5. Congelamento de Células:

As células podem ser congeladas por um longo período e bem estocadas, não correm o risco de mudança de fenótipo e de serem danificadas. As células eram congeladas quando estavam em fase logarítmica de crescimento. Células confluentes (75 a 80%) eram tratadas com Tripsina/EDTA, conforme citado acima, logo após com adição de meio completo, na quantidade necessária para inibir a ação da tripsina (1/10). Após, eram contadas em câmara de Neubauer e centrifugadas (1300 rpm durante 10 minutos ou 1500 rpm durante 5 minutos). O precipitado era ressuspensão por fluxo refluxo em meio de congelamento (95% de soro fetal bovino contendo 5% de DMSO- crioprotetor, que reduz o ponto de congelamento e permite uma taxa de resfriamento menor), no volume para que as células ficassem numa concentração final de 10^8 ou 10^7 cels/ml. Eram assim pipetadas alíquotas contendo 1 ml da suspensão celular em tubos de congelamento previamente marcados. Os tubos eram bem fechados, quando iniciava-se o congelamento que deve ser de forma lenta para se reduzir o risco de formação de cristais de gelo e conseqüente lesão das células. Inicialmente os tubos eram colocados no gelo e, na seqüência a -20°C durante 30 min, e de 1 h a 18h, a -70°C , para serem, então, transferidos para o nitrogênio líquido.

6. Descongelamento das Células: A eficiência do congelamento era testada por descongelamento, onde o conteúdo de 1 a 1,8 ml do criotubo era mantido a 37° por um período necessário para o descongelamento. Uma vez descongeladas, colocava-se este conteúdo em garrafas de cultura contendo meio completo, que permaneciam em estufa conforme citado anteriormente até o dia seguinte, para que as células aderissem, quando então se trocava o meio, para eliminação completa do DMSO.

III. Experimento com células eucarióticas

1. Avaliação da eficiência de plaqueamento com as linhagens MRC5 e XPD: Esta avaliação foi feita com diversas concentrações de células, sugeridas pela literatura. Assim, células da linhagem MRC5 e XPD foram tratadas com tripsina/EDTA e ressuspensas para a contagem em câmara de Neubauer. Após, foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro (em duplicata) nas diversas concentrações em meio de cultura completo e mantidas em estufa 24 horas. Após isto, avaliava-se a confluência das células, em microscópio óptico invertido com contraste de fase, a qual deveria estar por volta de 80%. A densidade de 5×10^4 células / ml foi escolhida para os experimentos com as duas linhagens celulares.

2. Escolha da dose de MET a ser utilizada nos experimentos:

Dados na literatura indicam que, a MET em uma dose dita terapêutica, de 100 μ M, inicia sua ação em cadeia respiratória mitocondrial celular, inibindo o complexo I e promovendo estimulação da AMPK (Guigas, 2004; Hardie, 2007). Assim, testamos esta dose, tratando células da linhagem MRC5 (selvagem) onde se observou uma tendência ao efeito de proteção da MET contra os efeitos nocivos do UVC. Com o objetivo de amplificar este efeito, realizamos nossos experimentos com uma dose dez vezes maior (1 mM).

3. Escolha das doses de UVC para serem utilizadas em experimentos posteriores

As doses de UVC foram escolhidas a partir da literatura, para as células XPD e MRC5. Para XPD, foram 1, 2 e 3 J/m² e MRC5: 10, 20 , e 30 J/m² respectivamente. (Carvalho *et al.*, 2003; Armelini *et al.*,2005).

Quadro 12: Doses da irradiação de UVC utilizadas nos experimentos para as linhagens celulares MRC5 e XPD

Linhagem Celular	UVC (J/m²)
MRC5	10, 20, 30
XPD	1, 2, 3

4. Experimentos de sobrevivência celular

Células tratadas, ou não, com MET, irradiadas, ou não, com UVC :

Células das linhagens MRC5 e XPD foram tratadas com tripsina, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer conforme descrito nos itens acima. Em seguida, foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro (em duplicata para cada tratamento posterior) na densidade de 5×10^4 células/ml em meio de cultura completo e incubadas em estufa, 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ e com 95% de umidade, por 14 a 16 hs, período necessário para a aderência das células na placa. Após, retirava-se o meio das placas, seguindo-se da lavagem com salina. O tratamento era feito com solução de DMEM, na ausência de soro, acrescido de MET (1 mM) , diluída em água destilada estéril e filtradas em filtro Millipore de 0,22 µm. As placas eram incubadas durante 24 hs em estufa nas mesmas condições anteriores.

Preparação das placas para a irradiação: Na sequência, retirou-se o meio e lavou-se com salina para a retirada da droga, pois como já citado anteriormente, a MET absorve na faixa do UVC. Eram, então, adicionados 2 mL de PBS (mantido a 37° C) para a irradiação, ou não, que era feita sobre a placa destampada com lâmpada germicida (15W, General Electric G15T8, EUA com mais de 95% das emissões em 254 nm), nas doses referidas acima. A dosimetria foi realizada com dosímetro Vilbert-Lourmat Radiometre VLX-254. Após a irradiação, retirava-se o PBS e adicionava-se DMEM completo, retornando-se com as placas para a estufa em condições anteriores, por mais 3 dias. Passado este período, seguia-se a contagem das células, em cada placa, através do método de verificação de viabilidade pela exclusão do Azul de Trypan. Na sequência, retirava-se o meio das placas, lava-se com salina, para a retirada total do meio, e incubava-se com tripsina (500 µL de tripsina por placa), durante 1 min em estufa a 37°C e observadas ao microscópio, quando então deveriam estar soltas e, em seguida, adicionava-se 1 mL de meio completo, fazendo-se fluxo-refluxo, para serem, então, retiradas alíquotas (20 µL) que eram incubadas com 20 µL de azul de Trypan (2%), por 4 min. Em seguida, retirava-se 20 µL e colocava-se na Câmara de Neubauer, sendo determinado o percentual de células viáveis e, para tanto, eram consideradas inviáveis as células que incorporavam o corante e viáveis as que o excluía. Estes experimentos foram repetidos por 5 vezes.

Determinação das frações de sobrevivência e análise estatística:

Foram determinadas as frações de sobrevivência (FS), para as diferentes doses de irradiação utilizadas. As FS (N/N_0) eram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis, após cada dose de UVC (N), pelo número de células viáveis, não irradiadas (N_0). As frações de sobrevivência foram lançadas nas ordenadas, contra as doses de radiação nas abscissas em gráfico de coordenadas ortogonais. Nesse gráfico, cada coluna representa o valor médio de 5 experimentos, com os respectivos erros padrão. Estes dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism4, sendo que uma diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ pelo teste t de Student na análise dos tratamentos de interesse .

Células tratadas ou não com MET e insulina, irradiadas ou não com UVC:

Para este experimento, foi utilizada insulina Novolin R (Novo Nordisk® Brasil), na concentração de 10 nM, dose esta referida por Merkel *et al.* (2003), ter provocado um grande aumento nos níveis de RNAm de XPD. Assim, células das linhagens MRC5 e XPD foram tratadas com tripsina, ressuspensas, contadas e plaqueadas conforme descrito nos itens acima. Em seguida, procedeu-se ao tratamento, ou não, com MET (1 mM) e com insulina (10 nM), ou não, durante 24hs em estufa conforme já descrito.

Preparação das placas para a irradiação: Seguiam-se os procedimentos já descritos acima.

Determinação da fração de sobrevivência e análise estatística:

Após a determinação da fração de sobrevivência, e construção do gráfico, foram calculadas as médias e erro padrão de três experimentos. Estes dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism4, sendo que uma diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ pelo teste t de Student na análise dos tratamentos de interesse .

5. Ensaio Luciferase:

Linhagem celular MCF7, derivada de adenocarcinoma mamário, MCF7, transfectada com plasmídeo recombinante contendo a região promotora do gene *BRCA1*, e o gene codificante da proteína luciferase (chamado de gene repórter), foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço em meio de cultura completo e incubadas em estufa, 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ e com 95% de umidade. Após, retirava-se o meio das placas, seguindo-se da lavagem com salina. O tratamento era feito com solução de DMEM, na ausência de soro e antibióticos, acrescido ou não de MET (1mM), diluída em água destilada estéril e filtradas em filtro Millipore de 0,22 µm e insulina. A placa era incubada durante 24hs em estufa nas mesmas condições anteriores. Atividade relativa de luciferase foi avaliada seguindo o protocolo do kit “*Dual-glo luciferase assay system*” (Promega), utilizando luminômetro de placa. Os valores obtidos foram normalizados e as médias das duplicatas avaliadas. Não foram feitas análise estatísticas por se tratar de experimento único.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo, demonstrar em procariotos e eucariotos, uma possível ação de uma droga anti-hiperglicemiante (MET) em sistemas de reparo de DNA. Inicialmente, o que nos levou a pensar nesta possível nova ação para a MET foi um estudo anterior do grupo utilizando-se o ensaio do Cometa, no qual se detectou uma importante quantidade de quebras no DNA de células sanguíneas de ratos portadores de diabetes mellitus experimental (Claudio, 2005). Este resultado era esperado, pois vários autores já haviam relatado essa alteração em DM, devido à elevada produção de ERO (Gil-del Valle *et al.*, 2005; Johansen *et al.*, 2005; Lodovici *et al.*, 2007). Mas, após o tratamento com MET e reavaliação pelo mesmo teste, observou-se que estes animais apresentavam reversão da genotoxicidade, induzida por DM, quando comparados ao grupo controle, resultado este que ainda não havia sido relatado anteriormente (Claudio, 2005). Poder-se-ia pensar que a MET estivesse atuando somente como um agente antioxidante, mas ocorre que o tratamento foi administrado após as quebras do DNA terem ocorrido, isto é, houve uma reversão da genotoxicidade, não podendo ter sido atribuída, simplesmente, à ação de um antioxidante. Khouri *et al.* (2004) relataram que a MET é uma droga antioxidante, mas não um bom sequestrador de ERO, *in vitro*, já que não foi capaz de sequestrar os radicais $O_2^{\bullet-}$. Esses autores sugeriram que esta ação da MET, *in vivo*, seja feita por outras vias, como por aumento da atividade de enzimas antioxidantes, diminuição dos marcadores de peroxidação lipídica e inibição da formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs). Merckel *et al.* (2003), relataram que pacientes portadores de DM apresentam acúmulo de mutações, devido à danos em DNA e que os mecanismos pelos quais estas lesões não são removidas através de vias de reparo, não estão ainda bem esclarecidos, até o momento. Em adição, Blasiak *et al.* (2004) demonstraram que no DM ocorre uma diminuição da eficiência de reparo de DNA (Kirpichnikov, 2002).

No momento, estamos sugerindo que a MET tenha revertido esta genotoxicidade, não somente por sua ação antioxidante, mas, também, por ativar sistemas de reparo de DNA. Assim, reiniciamos nossa pesquisa, em procariotos, utilizando cepas bacterianas de *E. coli*, deficientes ou não em enzimas de reparo de DNA. Sabemos que enzimas pertencentes a sistemas de reparo de eucariotos e de procariotos, apresentam homologia funcional, existindo, no entanto, diferenças em suas estruturas e quantidade de enzimas requeridas nas diferentes etapas do processo (Costa, 2003). Neste trabalho, utilizamos como agente causador de danos, o UVC, que apresenta como principais lesões, os fotoprodutos 6-4 PPs e CPDs (Murphy, 1975; Pfeifer, 1997; Friedberg, 2006).

1. Escolha da concentração da MET

Os experimentos foram iniciados, com a escolha da concentração de MET para ser utilizada, já que a literatura não apresentava estudos com MET em procariotos. Assim, a figura 6 apresenta a curva de sobrevivência da cepa AB1157, tratada com diversas concentrações de MET. Escolheu-se uma concentração, onde houvesse apenas uma diminuição de sobrevivência, próxima a de uma dose subletal, para que se pudesse observar melhor, se esta substância promoveria alguma variação na sobrevivência de células irradiadas com UVC. De acordo com os resultados apresentados na fig 6, a concentração escolhida foi de 20 mg/ml (correspondendo a 168mM).

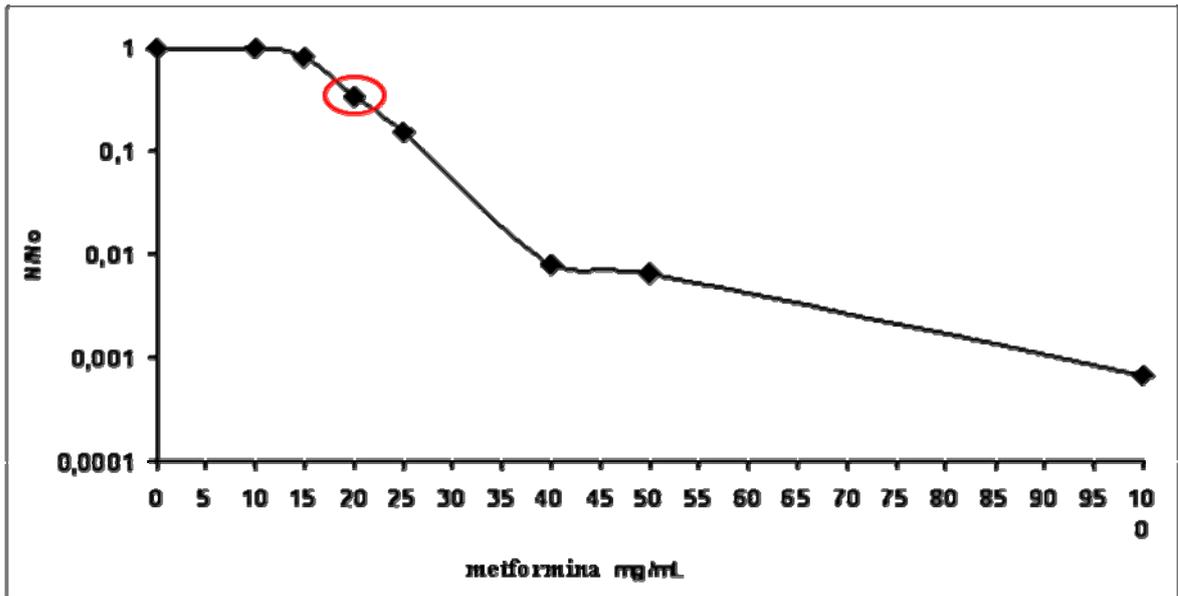


Figura 6: Curva de sobrevivência de *E.coli* AB1157 à MET. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas por 60 min com diferentes concentrações de MET, a 37°C com agitação, retirando-se alíquotas para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem às médias das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes concentrações de MET.

2. Espectro de absorção da MET na região do UVC

Uma vez que o UVC seria utilizado como agente indutor de lesões no DNA, determinou-se o espectro de absorção da MET, com relação a este agente, sendo observado que a MET absorve na região do UVC (figura 7). Desta forma, era necessário que a MET não estivesse presente durante a irradiação, para não interferir com a dose real de UVC, aplicada na cultura. Assim, após cada tratamento com MET, lavava-se a cultura duas vezes para garantir que houvesse a retirada total da droga, antes da irradiação.

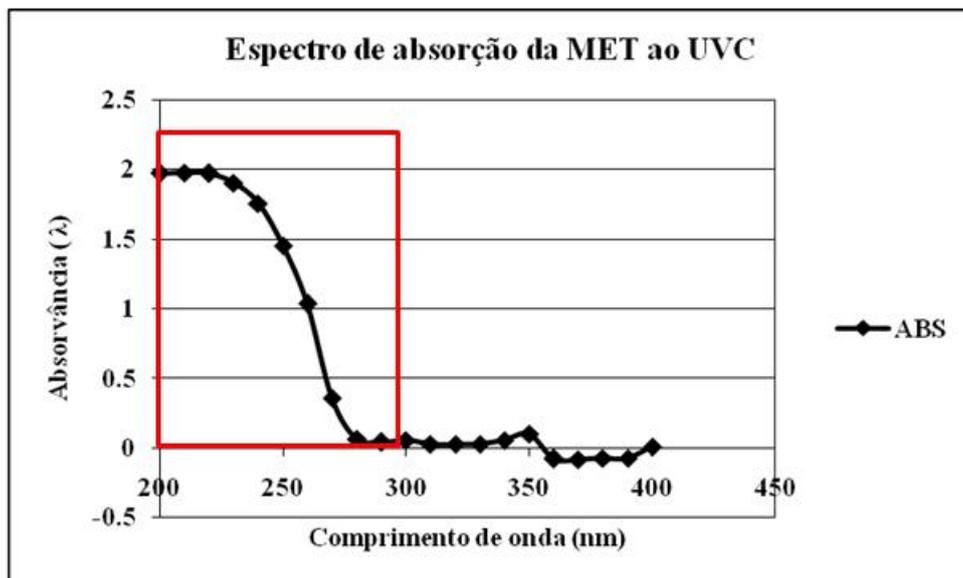


Figura 7: Espectro de absorção da MET na faixa de 200 a 400 nm. Quadro vermelho indica a faixa de comprimentos de onda do UVC. Solução de MET, em água destilada, (20mg/ml), foi colocada em cubeta de quartzo para leitura da absorvância em espectrofotômetro. Essas leituras foram feitas sempre contra um branco, contendo apenas água destilada.

3. Cinéticas de inativação das cepas bacterianas

A. Tratamento das cepas bacterianas com MET

As figuras abaixo apresentam os resultados dos experimentos, referentes às cinéticas de inativação bacteriana à MET (20mg/ml) das cepas AB1157, AB1884, 1885, 1886, BH20, BW527, BW9091, GY4763 e AB2463.

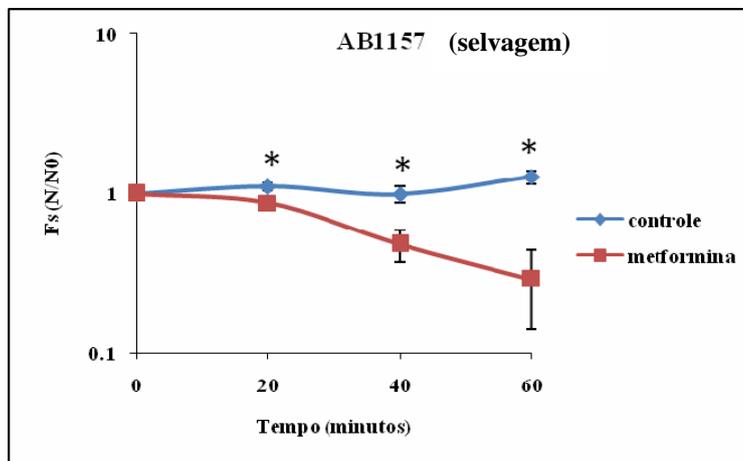


Figura 8: Cinética de inativação da cepa AB1157 (selvagem), tratada com MET, durante 60 minutos. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença, ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

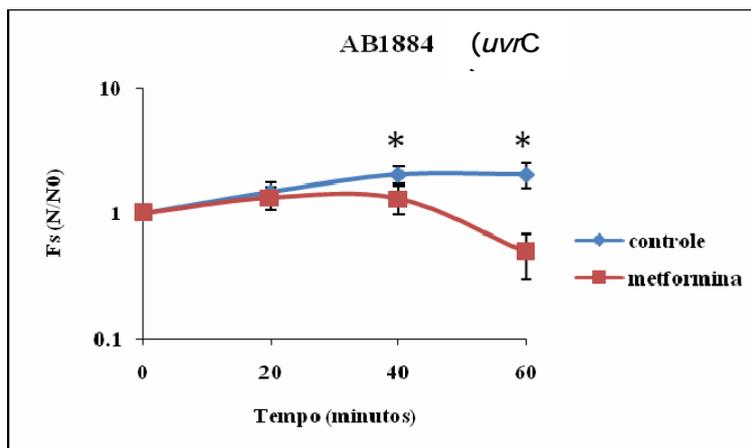


Figura 9: Cinética de inativação da cepa AB1884 (*uvrC*), tratada com MET, durante 60 minutos. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença, ou não, de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

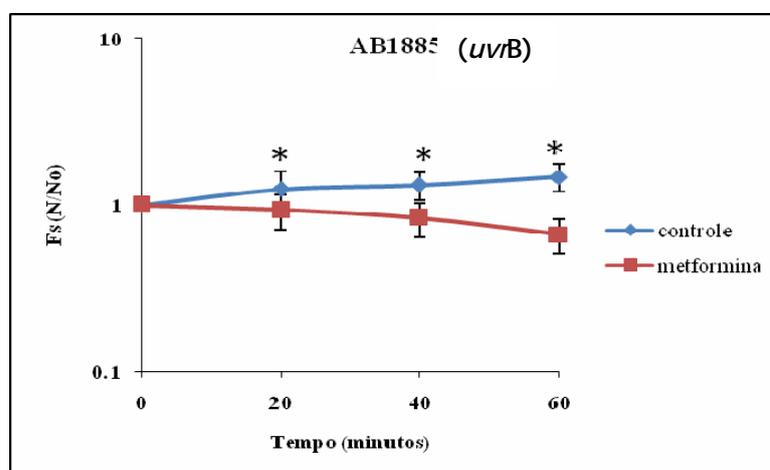


Figura 10: Cinética de inativação da cepa AB1885 (*uvrB*), tratada com MET, durante 60 minutos. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

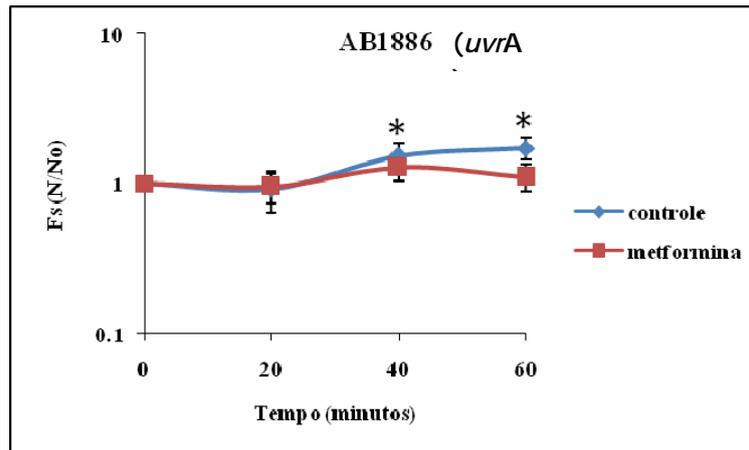


Figura 11: Cinética de inativação da cepa AB1886 (*uvrA*), tratada com MET, durante 60 minutos. Células em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$

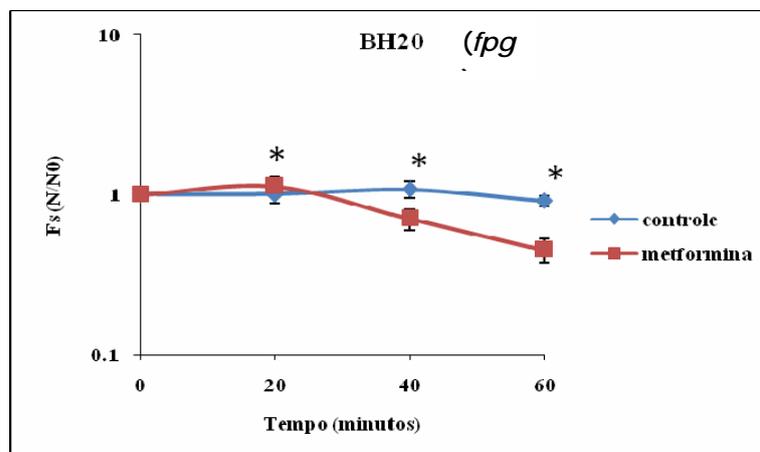


Figura 12: Cinética de inativação da cepa BH20 (*fpg*), tratada com MET, durante 60 minutos. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

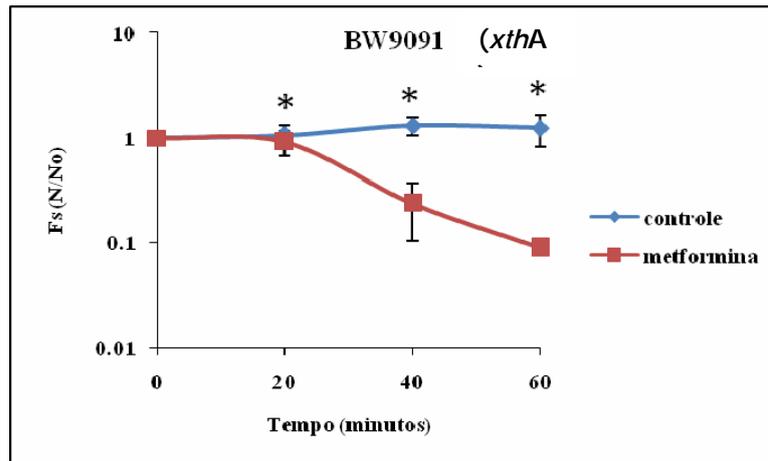


Figura 13: Cinética de inativação da cepa BW9091(*xthA*), tratada com MET, durante 60 minutos. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

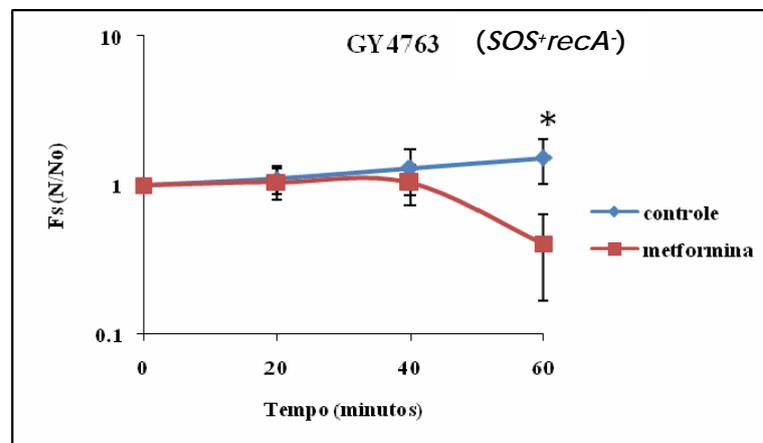


Figura 14: Cinética de inativação da cepa GY4763(SOS^+recA^-) tratada com MET, durante 60 minutos. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

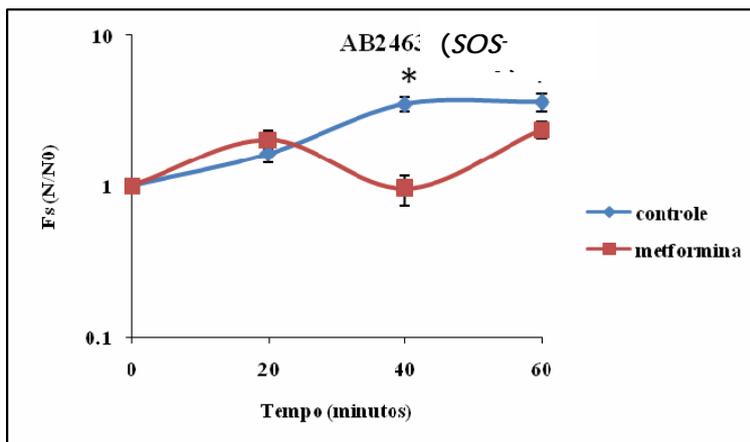


Figura 15: Cinética de inativação da cepa AB2463 (*SOS⁻ recA⁻*) tratada com MET, durante 60 minutos. Células de *E.coli*, em fase exponencial de crescimento, foram incubadas na presença, ou não, de MET (20mg/ml) à 37°C com agitação, retirando-se alíquotas de 20 em 20 minutos para determinação das frações de sobrevivência. Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nos diferentes tempos de incubação com a MET. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar o tratamento, ao longo dos 60 minutos. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

Os resultados demonstraram para todas as cinéticas de inativação apresentadas acima, reduções nas frações de sobrevivências (da selvagem e das mutantes) promovidas pela MET, em relação aos respectivos controles, ao final de 60 minutos de incubação, ainda que significativas ($p < 0,05$), não foram maiores que uma ordem de grandeza. Isto era esperado, já que estávamos utilizando uma concentração da droga, próxima à subletal. Exceção foi a BW9091 que, aos 60 minutos teve sua cinética de inativação alta para uma subletalidade da droga. Assim para termos mais segurança, quanto à subletalidade da concentração de MET, continuamos os experimentos com o tratamento por 40 minutos e não mais por 60 minutos.

B. Irradiação com UVC de células pré-tratadas com MET

Continuando nosso objetivo de avaliar a ação da MET sobre os sistemas de reparo, os gráficos abaixo demonstram os resultados do pré-tratamento com a MET, seguido da irradiação com UVC.

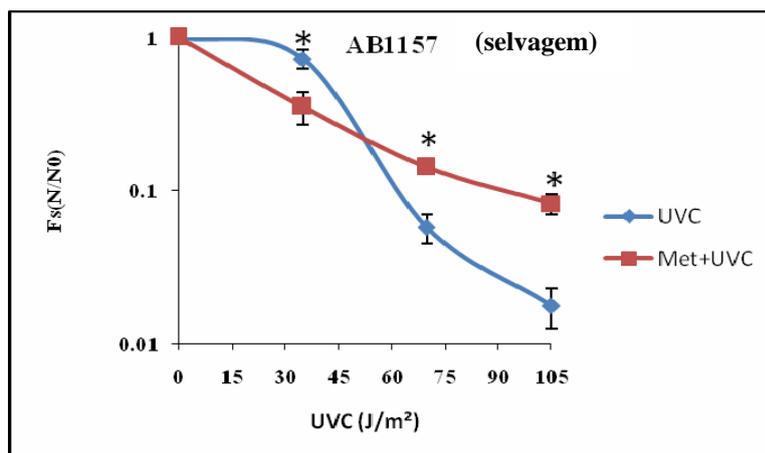


Figura 16: Curva de sobrevivência da cepa AB1157(selvagem), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (35, 70 e 105 J/m^2). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N_0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para comparação dos resultados. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

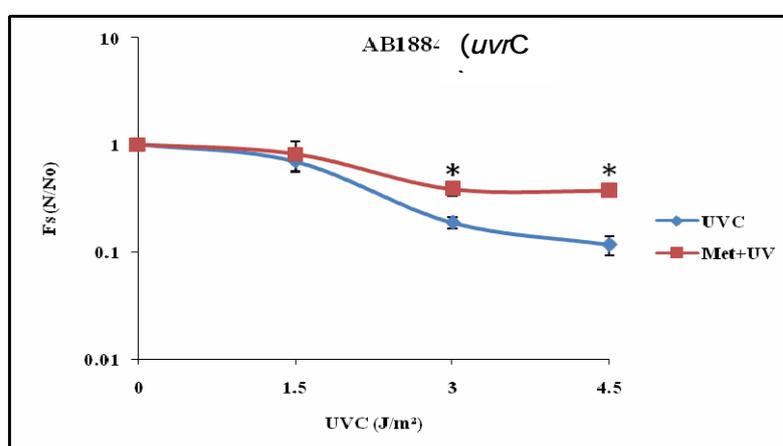


Figura 17: Curva de sobrevivência da cepa AB 1884 (*uvrC*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) a 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (1,5; 3; e 4,5 J/m^2). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N_0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

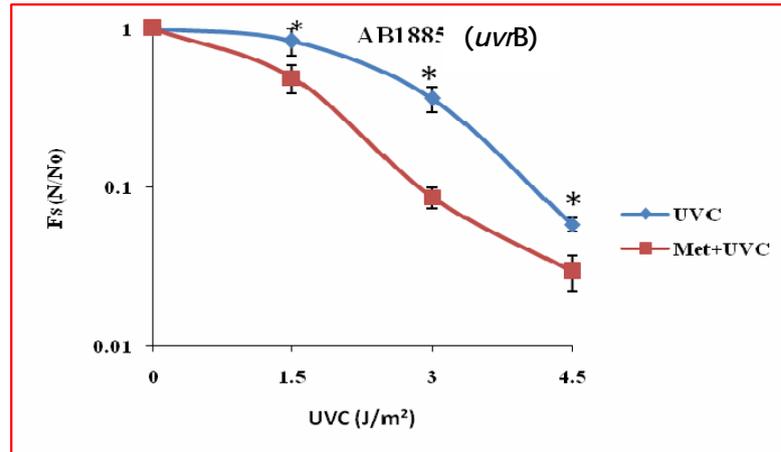


Figura 18: Curva de sobrevivência da cepa AB1885(*uvrB*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli*, em fase exponencial de crescimento, foram incubadas na presença, ou não, de MET (20mg/ml) à 37°C, sob agitação, durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (1,5; 3; e 4,5 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

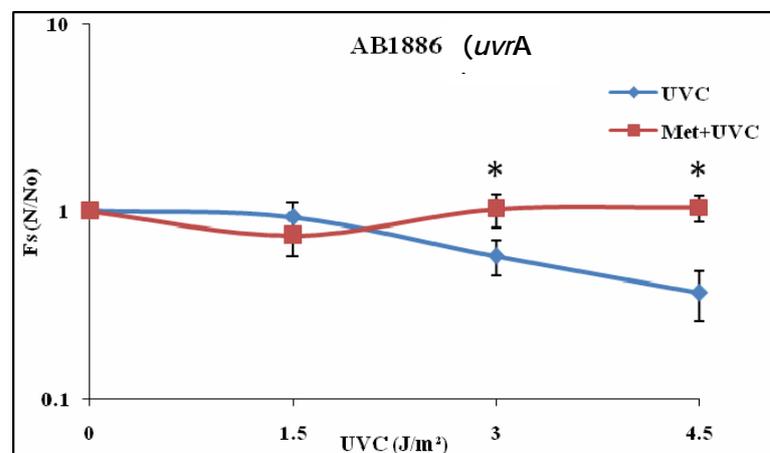


Figura 19: Curva de sobrevivência da cepa AB1886 (*uvrA*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (1,5; 3; e 4,5 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

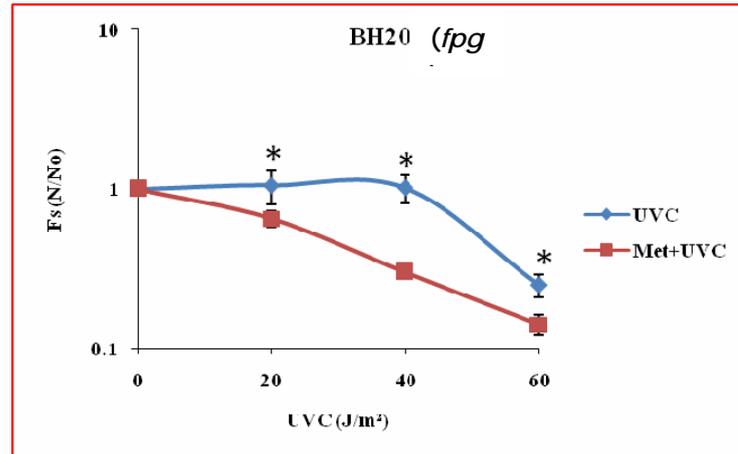


Figura 20: Curva de sobrevivência da cepa BH20 (*fpg*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (20; 40; e 60 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

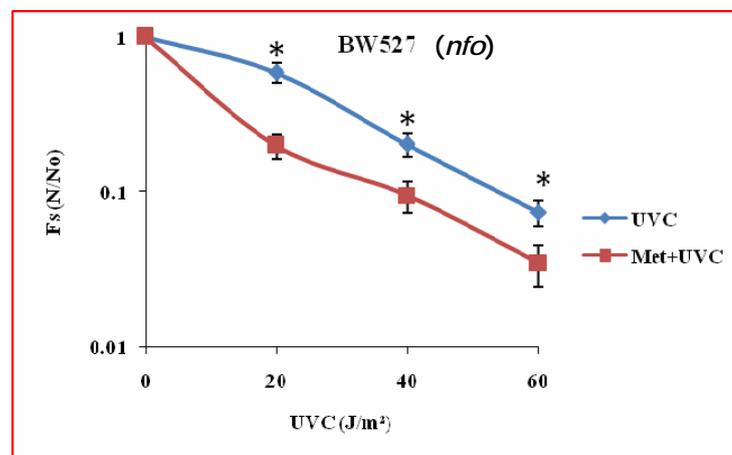


Figura 21: Curva de sobrevivência da cepa BW527(*nfo*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (20; 40; e 60 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

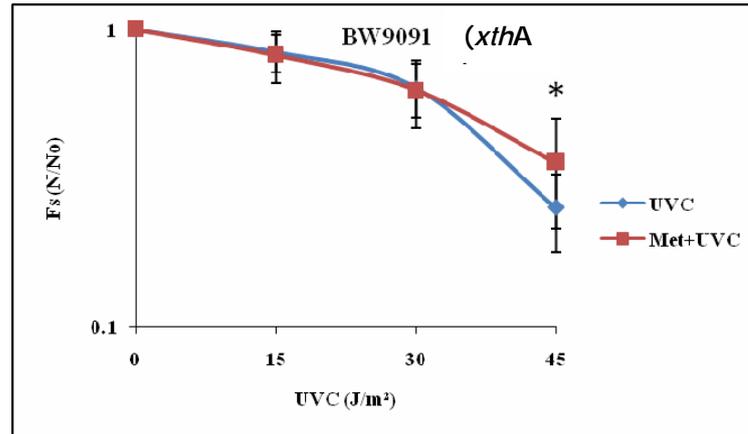


Figura 22: Curva de sobrevivência da cepa BW9091 (*xthA*), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (15; 30 e 45 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

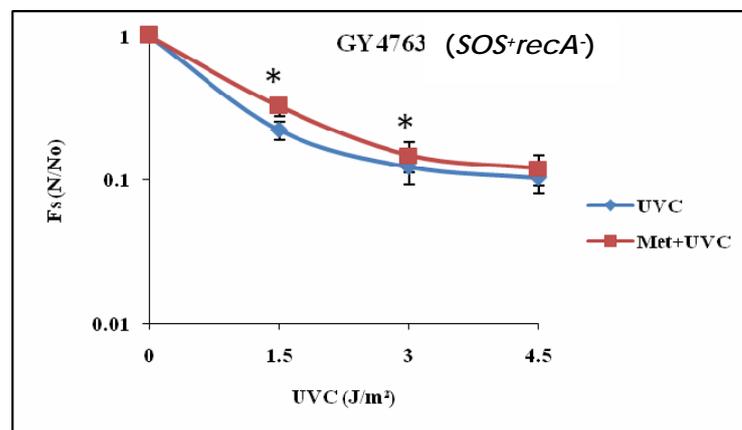


Figura 23: Curva de sobrevivência da cepa GY4763 ($SOS^+ recA^-$), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (1,5; 3; e 4,5 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

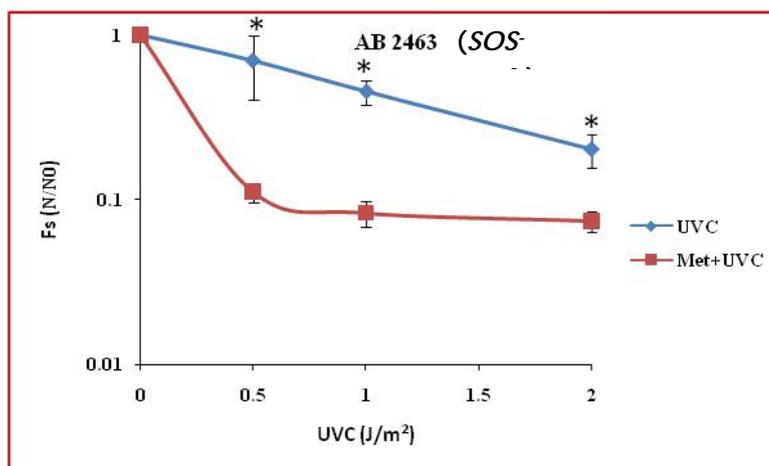


Figura 24: Curva de sobrevivência da cepa AB2463 ($SOS^- recA^-$), pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (0,5; 1; e 2,0 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

As curvas de sobrevivência das cepas AB1157 (selvagem), AB1884, AB1886, BW9091 (no ponto 45J/m²) e a GY4763 (nos pontos 1,5 e 3J/m²), figuras 16, 17, 19, 22 e 23, quando pré-tratadas com MET e irradiadas com UVC (MET+UVC), foram significativamente maiores, ao final das irradiações ($p < 0,05$), do que as das respectivas frações tratadas somente com UVC. Demonstrou-se, assim, que a MET foi capaz de aumentar a sobrevivência dessas cepas contra a ação do UVC, apesar da ausência de algumas enzimas de reparo nas mutantes, demonstrando que a MET não necessita destas, para promover sua proteção. Já nas cepas AB1885, BH20, BW527 e a AB2463 isto não ocorreu (figuras 18, 20, 21 e 24). As curvas de sobrevivência à MET+ UVC foram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação às frações tratadas somente com UVC, demonstrando-se, então, que a falta dos genes de reparo, nas quais estas cepas são deficientes, *uvrB* (NER), *fpg* (BER), *nfo* (BER), e *rec* (SOS), interferiu na ação de proteção induzida pela MET. Infere-se que, em procarionotos, a MET só produzirá seu efeito protetor contra a radiação UVC se os genes que codificam para essas enzimas estiverem presentes e funcionantes.

Do exposto acima, conclui-se pela importância de três genes de reparo de DNA, atuando neste fenômeno de proteção da MET, quais sejam a *uvrB* (NER), *fpg* e *nfo* (BER) e *rec* (SOS).

Com relação ao BER, isto poderia ser uma indicação de que o efeito antioxidante da MET poderia, também, ser creditado à indução deste sistema de reparo, pois este mecanismo é apontado como principal responsável pelo reparo de lesões oxidativas.

Com relação à participação do NER, o resultado da figura 18, indica que o gene *uvrB* seja importante para a observação do fenômeno de proteção. A literatura descreve que o mesmo pode ser induzido em procariotos por duas vias, uma delas dependente de SOS (EcoCyc (<http://EcoCyc.org>)). Nos experimentos com as cepas, GY4763 (SOS⁺ rec⁻) e AB2463 (SOS⁻ rec⁻) observamos que a ausência da atividade de recombinação (GY4763), não impediu a ação protetora da MET, de acordo com a figura 23, sugerindo que em bactérias, a regulação do efeito da MET não envolva o gene *recA*, pelo menos no que se refere à sua atividade de recombinação homóloga. É importante lembrar que essa cepa, apesar da deficiência de *recA*, possui a sua atividade de co-protease ativa e, conseqüentemente, sua capacidade de induzir as funções SOS. Por isso resolvemos testar uma cepa deficiente em todas as atividades ligadas ao gene *recA*, inclusive naquela que leva a indução das funções SOS (AB2463).

Os resultados apresentados na figura 24 sugerem que o efeito protetor mediado pela MET seja via ativação das funções SOS. Para corroborar este resultado, realizamos o ensaio SOS cromotest.

4. SOS Cromoteste

Os resultados obtidos no experimento do SOS cromoteste apontam para uma tendência de que a fração MET +UVC, seja maior que a fração UVC isoladamente. Aqui justificamos o termo tendência utilizado acima por termos apenas os resultados correspondentes a 2 experimentos e, portanto, por não haver ainda amostragem suficiente para avaliação estatística do resultado. Não podemos, no entanto, deixar de destacar que em ambos os experimentos a aparente diferença encontrada ocorreu no mesmo sentido, sugerindo, assim, uma possível ação da MET em sistema SOS, que estaria se somando à indução SOS das próprias células, irradiadas com UVC.

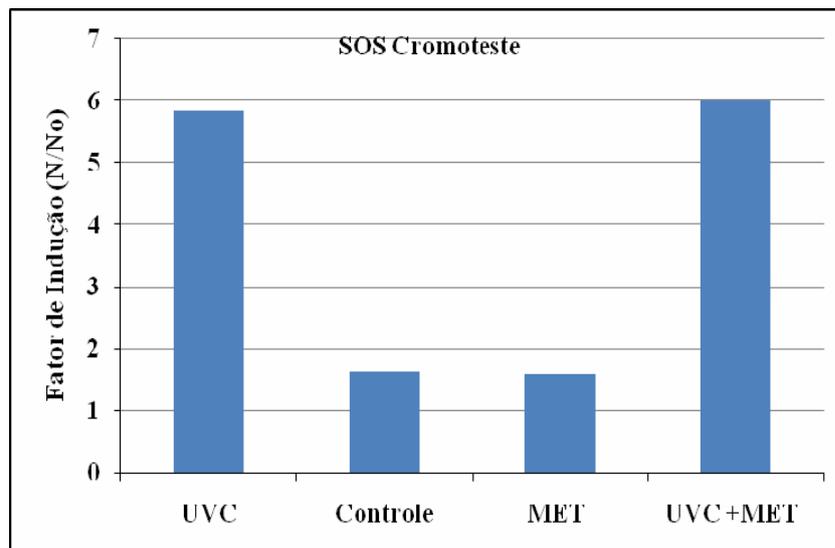


Figura 25: Ensaio SOS Cromoteste onde se utilizou a cepa bacteriana *E. coli* PQ35 (contendo uma fusão do promotor de um gene SOS com o estrutural do operon lacZ: *sfiA*(antigo *sfiA*):lacZ). Indução da β -galactosidase pelo UVC, MET e UVC+MET. Cultura em fase exponencial de crescimento foi pré- tratada, ou não, com MET (20mg/ml) durante 40 minutos e irradiada, ou não, com UVC (40J/m²). A seguir foram medidas as unidades de β -galactosidase e calculado o fator de indução. Os resultados correspondem à média de 2 experimentos.

5. Cinética de inativação das cepas bacterianas transformadas pré-tratadas com MET, seguido da irradiação com UVC

Para confirmar que a MET necessita das enzimas *UvrB*, *Nfo* e *Fpg* para ativar sistemas de reparo, utilizamos os plasmídeos pNP12, pFPG e pBW21 portadores dos genes nos quais as cepas AB1885, BH20 e BW527 são respectivamente deficientes. Assim, transformou-se essas cepas em proficientes na produção dessas enzimas. (figs 26, 27 e 28).

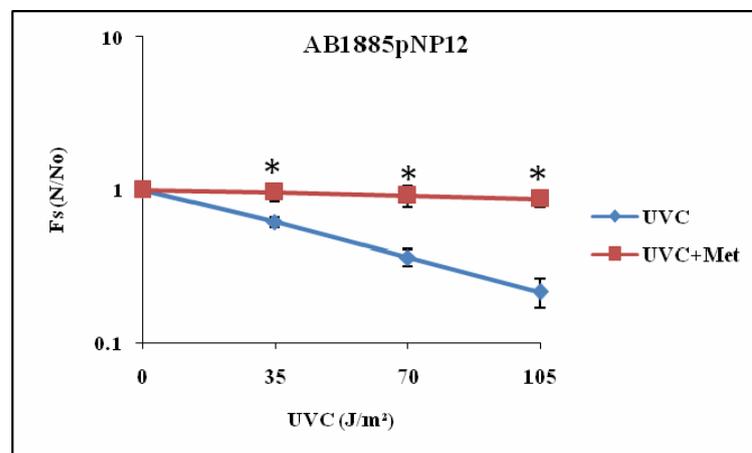


Figura 26: Curva de sobrevivência da cepa AB1885 pNP12 pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (45; 70; e 105 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$

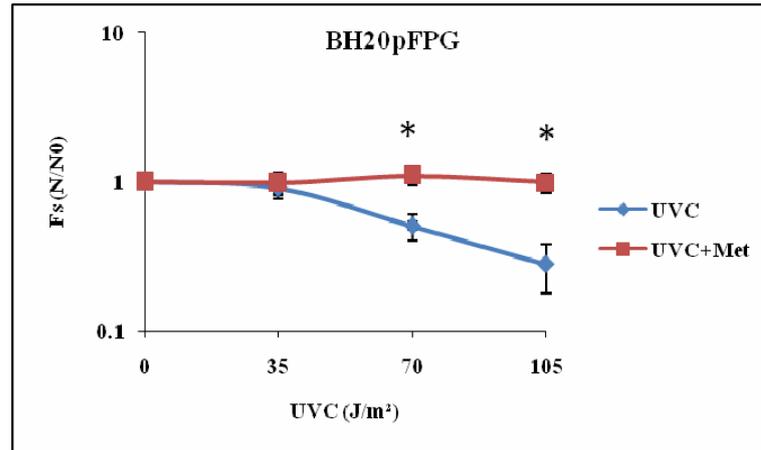


Figura 27: Curva de sobrevivência da cepa BH20 pFPG pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (35; 70; e 105 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

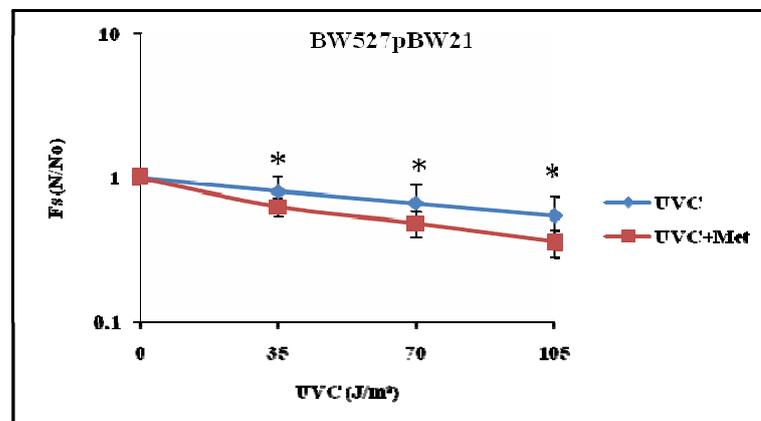


Figura 28: Curva de sobrevivência da cepa BW527pBW21 pré-tratada com MET e irradiada com UVC. Células de *E.coli* em fase exponencial de crescimento foram incubadas na presença ou não de MET (20mg/ml) à 37°C sob agitação durante 40 minutos e posterior irradiação com UVC (35; 70; e 105 J/m²). Os dados correspondem aos valores da média \pm desvio padrão das frações de sobrevivência (N/N0), nas diferentes doses de UVC. O teste estatístico ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey, foi utilizado para se comparar as curvas durante o tratamento com UVC. (*) As diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

Assim, a AB1885pN12 e a BH20pFPG responderam ao tratamento com sobrevivências semelhantes às da AB1157 (selvagem), isto é, tiveram suas curvas de sobrevivência à MET+UVC acima ($p < 0,05$) daquelas do controle somente com UVC (figuras 26 e 27). Desta maneira, podemos confirmar que a MET necessita destas enzimas (UvrB e Fpg) para promover sua atuação sobre o reparo de DNA nestas células, reafirmando sua ação sobre os mecanismos NER e BER.

Neste conjunto de experimentos de complementação, a única cepa que não respondeu à transformação, conforme as anteriores, foi a BW527pBW21 (gene *nfo*). Sua curva de sobrevivência, referente ao tratamento com MET+UVC, permaneceu menor que aquela somente com UVC. Não se pode dizer que ela não tenha sido transformada, pois testes de resistência a antibióticos foram realizados. Sugerimos, então, que o gene carregado pelo plasmídeo, não tenha sido capaz de expressar a proteína, com eficiência. Experimentos serão realizados posteriormente para avaliação da expressão gênica do plasmídeo.

6. ELETROFORESE ALCALINA EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese alcalina em gel de agarose (teste do cometa) é muito útil para o estudo da potencialidade genotóxica induzida por um agente. Também tem sido utilizado para o estudo de cinéticas de reparo em eucariotos (Tice *et al.*, 2000) e em procariotos (De Mattos *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos para se detectar danos em DNA de células eucarióticas, utilizando-se o teste do cometa, foram realizados por Olive *et al.*, (1990).

Posteriormente, o uso de diferentes sistemas de análise das imagens, atribuindo-se valores para a cauda do cometa, tem sido considerado um dos melhores testes para este fim (Dhawan *et al.*, 2009). Em nossos experimentos, utilizou-se o UVC, que como já é conhecido da literatura, provoca, principalmente, a indução de dímeros de pirimidina ciclobutano- CPDs (Friedberg *et al.*, 2006). Assim, esta versão alcalina do teste, não detecta danos do tipo CPDs, que alterem a conformação estrutural do DNA (Dhawan *et al.*, 2009). Portanto, o que está sendo visualizado nos gráficos abaixo, é o percentual de quebras provenientes da atividade de reparo, com o objetivo de corrigir estas lesões e, conseqüentemente, o desaparecimento destas quebras em função do tempo. Assim, quanto maior o rastro, maior a atividade de reparo.

A figura 29 abaixo demonstra resultado da eletroforese alcalina em gel de agarose e análise densitométrica do DNA de *E. coli* AB1157, pré-tratada, ou não, com 20 mg/ml de MET durante 40 minutos e irradiada, ou não, com 70 J/m² de UVC. Em seguida foi analisada a atividade de reparo durante 90 minutos com retiradas de alíquotas a cada 30 minutos.

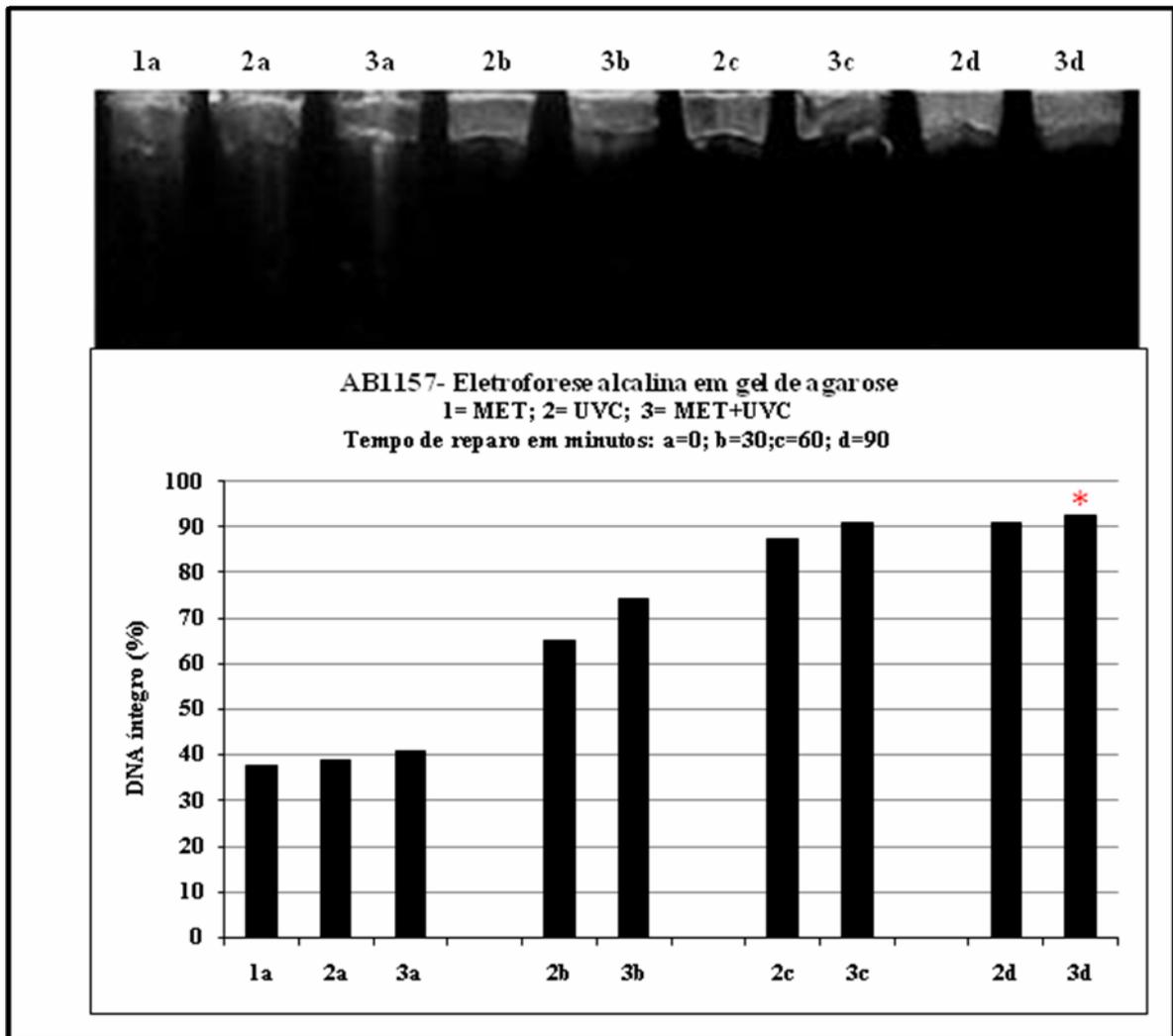


Figura 29: Eletroforese alcalina em gel de agarose e análise densitométrica do DNA de *E. coli* AB1157, pré-tratada, ou não, com 20 mg/ml de MET durante 40 minutos e irradiada ou não com 70 J/m² de UVC. Após a retirada de alíquotas para o tempo zero de reparo, as amostras eram colocadas em LB líquido, durante 90 minutos com retiradas de alíquotas a cada 30 minutos. Teste qui-quadrado (χ^2) * = $p < 0,05$ em relação a todas as outras frações correspondentes a DNA íntegro. Para facilitar a visualização dos resultados no gráfico, foram retirados os controles, MET, dos tempos 30, 60 e 90 minutos.

A figura 30, abaixo, demonstra resultado da eletroforese alcalina em gel de agarose e análise densitométrica do DNA de *E. coli* AB1157, pré-tratada, ou não, com 20 mg/ml de MET durante 40 minutos e irradiada, ou não, com 70 J/m² de UVC. Em seguida foi analisada a atividade de reparo durante 30 minutos com retiradas de alíquotas a cada 30 minutos.

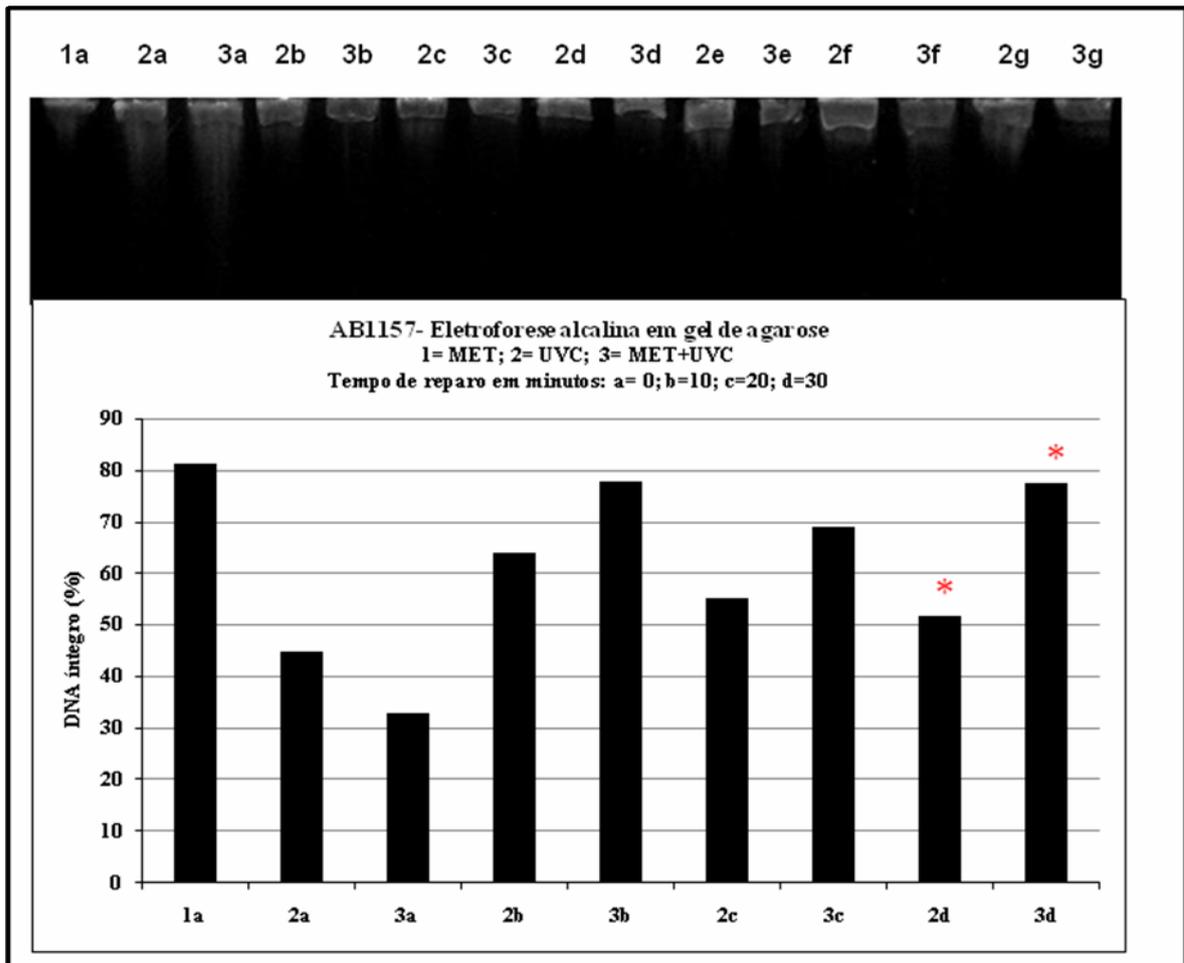


Figura 30: Eletroforese alcalina em gel de agarose e análise densitométrica do DNA de *E. coli* AB1157 pré-tratada ou não com 20 mg/ml de MET durante 40 minutos e irradiada ou não com 70 J/m². Após a retirada de alíquotas para o tempo zero de reparo, as amostras eram colocadas em LB líquido, durante 30 minutos com retiradas de alíquotas, a cada 5 minutos. Teste qui-quadrado (χ^2) * = $p < 0,05$ comparando as frações UVC e UVC+MET aos 30 minutos. Para um melhor entendimento do gráfico devido à grande quantidade de informações, foram retiradas as frações: controle e MET, dos tempos 10, 20 e 30 minutos.

Assim, as análises densitométricas dos géis obtidos revelaram que a cinética de reparo, durante 90 minutos, mostrou, como esperado, que a cepa irradiada com UVC, foi capaz de reparar seu DNA, já que apresenta todos os seus sistemas de reparo atuantes. No entanto, a fração MET+UVC, realizou o reparo com maior eficiência quando comparada com o tratamento somente com UVC ($p < 0,05$) (Figura 29).

Como na figura 29 verifica-se que após 90 minutos já havia se completado o reparo, resolveu-se estudar este processo em tempos menores, realizando-se, então, a cinética durante 30 minutos (figura 30). Os resultados obtidos demonstram que a fração MET+UVC promoveu o reparo com maior velocidade do que a fração UVC. A análise estatística, através do teste qui-quadrado da independência, confirmou este resultado onde foi verificado que a diferença era significativa ($p < 0,05$) entre elas. Conclui-se também, que a presença da MET resultou em uma maior velocidade de reparar o DNA, mesmo em tempos intermediários de reparo, da ordem de 30 minutos (figura 30).

Nossos estudos, até o momento, demonstraram que, em bactérias, a MET:

- 1- Necessita das enzimas de reparo *UvrB* (NER) e *Fpg* (BER), para exercer um papel protetor contra a ação deletéria do UVC, pois quando cepas deficientes nestas enzimas se tornaram proficientes nas mesmas, a MET promoveu uma proteção contra a ação do UVC, demonstrando ativação de NER e BER pela MET;
- 2- Promove reparo, quando analisada a eletroforese alcalina em gel de agarose;
- 3- Age no sistema SOS, conforme sugerido pelo SOS Cromoteste e confirmado pelo aumento da sobrevivência da cepa GY4763 ao dano no DNA provocado pelo UVC. Além disso, no tratamento com MET foi observada uma diminuição da sobrevivência da cepa AB2463 que não apresenta o sistema SOS, ao mesmo dano.

Assim, estes resultados tomados em conjunto, sugerem que em procariotos a MET pode induzir a ativação não só de sistemas de reparo de lesões em DNA (NER e BER), mas também resposta para sobrevivência bacteriana (funções SOS). Então, resolveu-se averiguar se estas mesmas respostas seriam observadas em eucariotos.

7. Experimentos com Células Eucarióticas

Foi observado nos experimentos com procariotos, que a MET age em sistemas de reparo de DNA, através dos genes *uvrB*, *fpg* e *rec* (SOS) pertencentes aos sistemas de reparo NER, BER e funções SOS, respectivamente. Dessa forma, resolvemos continuar o nosso trabalho verificando como este fenômeno estaria ocorrendo em eucariotos. No entanto, defeitos hereditários no BER até há pouco tempo atrás, não eram identificados fenotipicamente. Em 2002, Al Tassan *et al.*, observaram tumores intestinais com herança autossômica recessiva, atribuídos à mutação de genes participantes de BER (*MYH1*). Por outro lado, doenças humanas hereditárias em NER já são estudadas desde 1960 (Nousspikel, 2009) com a descoberta da doença denominada *Xeroderma pigmentosum*, o que facilitou nossos estudos neste sistema, pois existem bancos que armazenam células destes pacientes como é o caso do Centro de Estudos do Genoma Humano na USP, onde o professor Carlos Menck é pesquisador e nos cedeu, gentilmente, esta linhagem celular. Por este motivo, seguimos nossos experimentos com células eucarióticas (fibroblastos) provenientes de pacientes portadores da síndrome *Xeroderma Pigmentosum*, isto é deficientes da enzima de reparo XPD pertencente ao sistema NER, que apresenta homologia funcional com a enzima UvrB em bactérias (Bienstock *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003). Utilizamos como controle, células de indivíduos saudáveis, MRC5 (selvagem).

Utilizou-se a técnica de exclusão do azul de trypan para determinação da viabilidade celular que é ainda amplamente utilizada em trabalhos citados na literatura (Wielgus *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; McCall *et al.*, 2009).

A. Escolha da concentração de metformina e UVC

Na literatura encontramos experimentos com MET realizados com a sua dose dita terapêutica, de 100 μM , na qual ela inicia sua ação em cadeia respiratória mitocondrial celular, inibindo o complexo I e promovendo, com isto, uma estimulação da AMPK (Guigas *et al.*, 2004; Hardie, 2007). Foram realizados experimentos com esta dose e notava-se uma tendência ao efeito de proteção da MET. Com o objetivo de amplificar este efeito, realizamos nossos experimentos com uma dose dez vezes maior (1 mM).

As doses de UVC foram escolhidas a partir da literatura, para as células XPD e MRC5. Para XPD, foram 1, 2 e 3 J/m^2 e MRC5: 10, 20 , e 30 J/m^2 respectivamente. (Carvalho *et al.*, 2003; Armelini *et al.*,2005).

B. Sobrevivência das células MRC5 e XPD, pré-tratadas com MET e após, irradiadas com UVC

Após a definição das doses para o tratamento, tanto por MET quanto pelo UVC, para as duas linhagens celulares (MRC5 e XPD), avaliou-se a ação da MET em presença, ou não, do UVC.

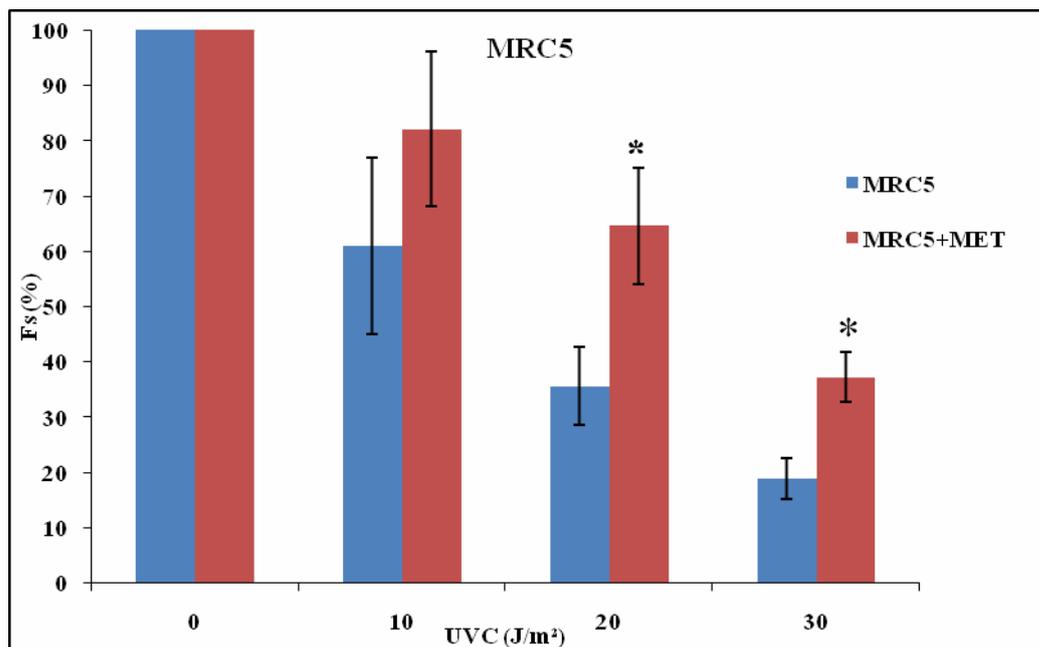


Figura 31: Sobrevivência da linhagem MRC5, pré-tratada com metformina (1mM) ,durante 24h, seguida de irradiação com UVC. Os resultados estão expressos em valores médios \pm erro padrão das porcentagens das frações de sobrevivência (N/N0) de cinco experimentos. * = $p < 0,05$ indica diferença significativa pelo teste t de Student.

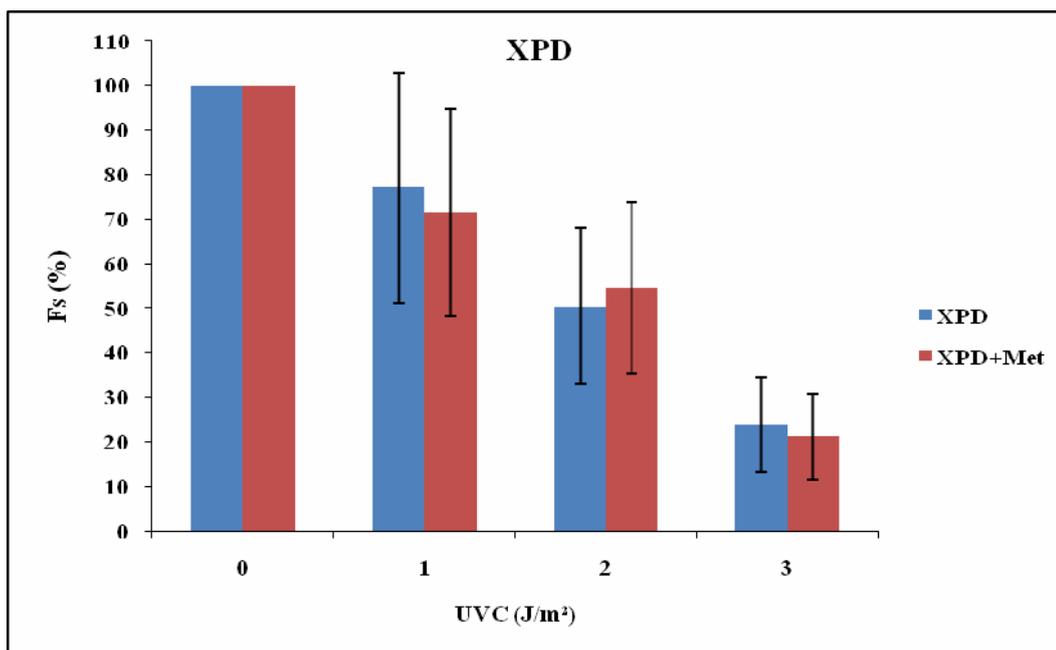


Figura 32: Sobrevivência da linhagem celular XPD, pré tratadas com metformina (1mM) durante 24hs e irradiadas UVC. Os resultados representam a média \pm o erro padrão da média do percentual da fração de sobrevivência (N/N0) de cinco experimentos.

Nas células MRC5 pré-tratadas com MET e, após, irradiadas com UVC, observou-se que nas doses de 20 e 30 J/m² de UVC, as células pré-tratadas com MET tiveram um percentual de sobrevivência significativamente maior ($p < 0,05$) em relação às células que não foram pré-tratadas com esta droga. Sabemos que as células MRC5 apresentam todos os sistemas de reparo, e a sobrevivência maior com o pré-tratamento com MET sugeriu que a proteção significativa desta droga contra os danos provocados pelo UVC, seja mediada pela ativação dos sistemas de reparo pela MET, o que ainda não havia sido demonstrado na literatura. Por outro lado, nas células XPD, o pré-tratamento com MET já não promoveu a proteção aos danos provocados pelo UVC. Sugere-se assim, que a MET dependa de algum fator ausente nestas células para que ocorra esta proteção. E este fator seria a enzima XPD, integrante do NER, na qual estas células são deficientes. Estes resultados sugerem que a MET apresente uma ação direta, ou indireta, em XPD. Nós sugerimos que a ação seja indireta, através da ativação de receptores de membrana do tipo tirosina-quinase (RI, IGF-IR e EGF-IR). Isto porque é descrito que a MET atue em receptores de insulina (Kumar & Dey, 2002; Merckel, *et al*, 2003), e que a insulina, regule a

síntese da enzima de reparo XPD, através da ativação da cascata de sinalização RAS, após estímulo de seu receptor (Merckel *et al*, 2003).

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados em bactérias, onde na cepa AB1885 (deficiente na enzima UvrB- participante do NER, que tem homologia com XPD), a MET, também não foi capaz de promover a proteção celular contra os efeitos do UVC.

Como é descrito que XPD pode ser induzido pela insulina, e que a MET age em receptores de insulina, realizamos curvas de sobrevivência ao UVC das células MRC5 e XPD, pré-tratadas com MET em presença ou não de insulina.

C. Sobrevivência das células MRC5 e XPD pré-tratadas ou não com MET e insulina e, posteriormente, irradiadas com UVC:

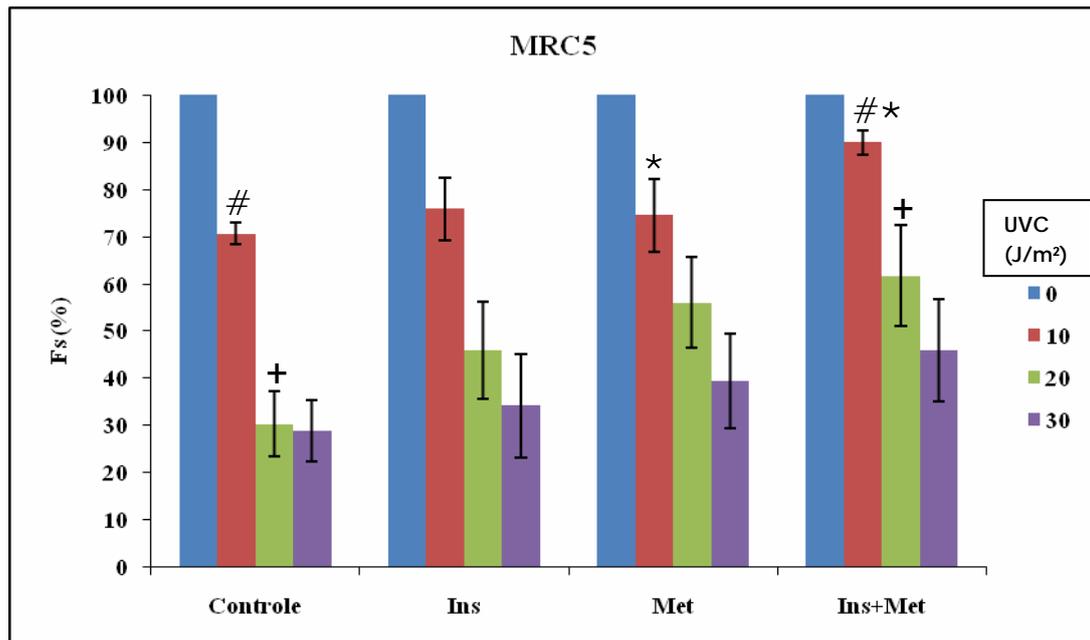


Figura 33: Sobrevivência das células MRC5 (selvagem), pré tratadas, ou não, com metformina (1mM) e insulina (10nM) durante 24hs e, após, irradiadas com UVC. Os resultados representam a média \pm erro padrão de três experimentos. #, +, * = $p < 0,05$.

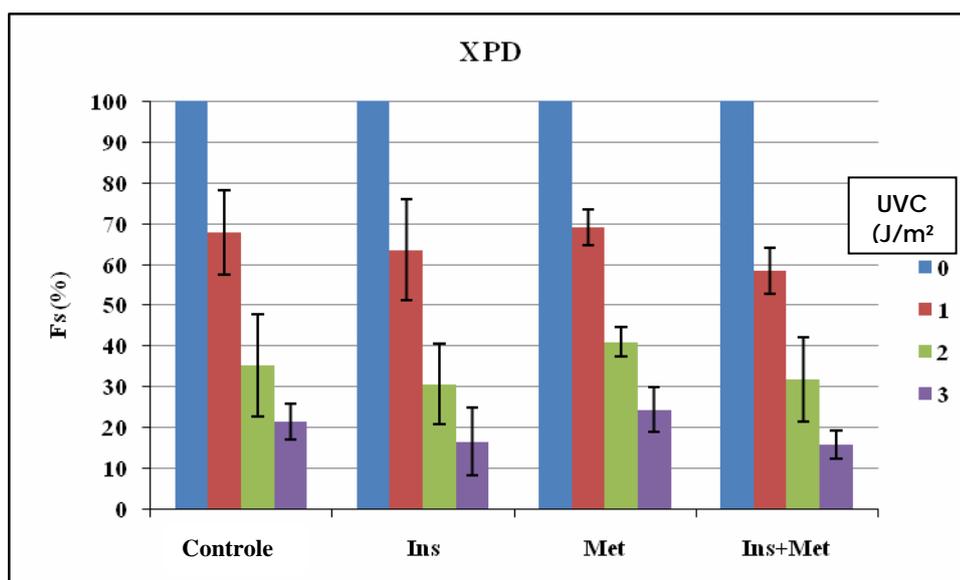


Figura 34: Sobrevivência das células XPD (deficiente no gene XPD) pré- tratadas ou não MET (1mM) e insulina (10nM) durante 24hs e, após, irradiadas com UVC. Os resultados representam a média \pm erro padrão de três experimentos.

Os resultados da figura 33, indicam que para a dose de 10 J/m², a MET+ Insulina foi capaz de promover um nível de proteção celular maior ($p < 0,05$) do que o obtido pela fração composta apenas pela MET. Isto pode ser devido a uma combinação de efeitos da MET com a insulina, em promover aumento da expressão de enzimas de reparo. Em relação ao controle (apenas irradiado), esta associação também mostrou-se importante para a proteção das células contra as lesões induzidas pelo UVC, nas doses de 10 e 20J/m². Observou-se que em doses de UVC maiores, onde as lesões aumentaram, a associação não demonstrou proteção em relação à MET e ao controle, ao contrário do observado na figura 31 para o tratamento somente com a

MET. Aachamos que nestas condições, pode estar ocorrendo alguma competição das drogas em relação aos receptores de insulina.

Por outro lado, os resultados da figura 34 não apresentaram nenhuma diferença significativa com relação às sobrevivências obtidas para todos os tratamentos testados. Assim, nem a insulina, nem a MET, nem a combinação das duas resultou em aumento da sobrevivência das células XPD à ação lesiva do UVC, sugerindo que um possível fator de proteção induzido, tanto pela MET quanto pela insulina, seja influenciado pela falta da enzima XPD.

D. Ensaio Luciferase

Como foi destacado na literatura (Jiralerspong *et al.*, 2009; Wright, 2009; Kisfalvi *et al.*, 2009) que pacientes diabéticos em uso de MET, apresentavam uma menor probabilidade e melhor prognóstico para alguns tipos de câncer, utilizamos a linhagem celular derivada de adenocarcinoma mamário, MCF7, transfectada com plasmídeo recombinante contendo a região promotora do gene *BRCA1*, no ensaio Luciferase (Figura 35).

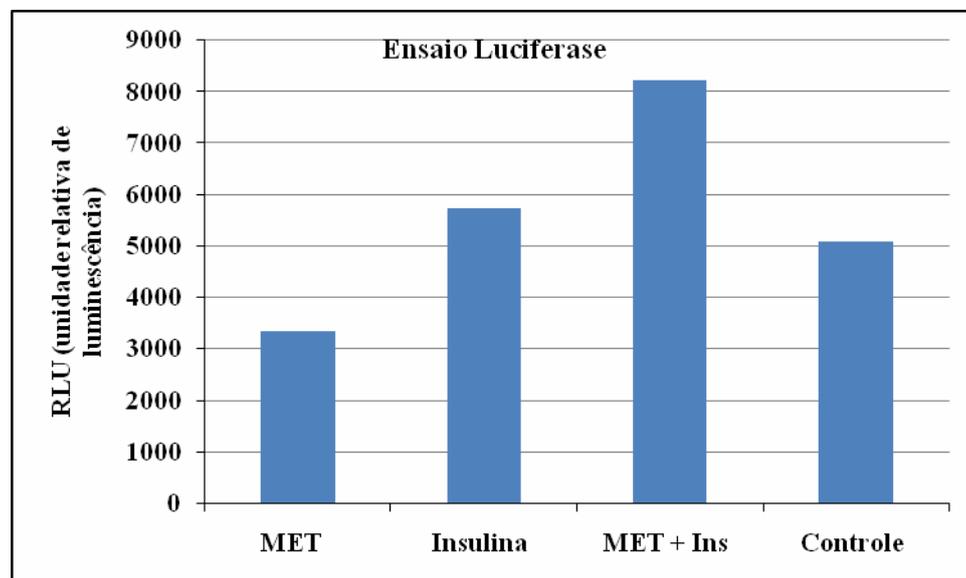


Figura 35: Ensaio Luciferase. Células MCF7 transfectadas com plasmídeo recombinante portador do promotor do gene *BRCA1*. Foram tratadas ou não com MET (1 mM) e insulina (10nM) com seus respectivos controles, em duplicatas, por 24 horas, mantidas em estufa (37° C com atmosfera de 5% de CO₂ e com 95% de umidade) e após avaliadas em luminômetro.

Ainda que os resultados apresentados na figura 35 se refiram a um único experimento, observa-se uma participação mais ativa da MET + insulina, na expressão do gene BRCA1, quando comparada às outras amostras testadas. A enzima BRCA1 está envolvida na reparação de quebras do DNA, interagindo com Rad 51, enzima participante do HRR (Nowosielska, 2007). A MET, sozinha, não apresentou efeito na expressão deste gene por, provavelmente, necessitar da presença da insulina para tal, ou da existência de algum estresse como, por exemplo, aquele a que é submetido um organismo diabético, ou ainda o de um sistema irradiado pelo UVC para que expresse genes participantes de mecanismos de reparo. Este resultado associado ao da figura 33 reforça a hipótese de que exista uma interação entre MET e insulina que favoreça a indução de sistemas de reparo de DNA.

Assim, é relatado que a insulina regule a síntese da enzima de reparo XPD, através da ativação da cascata de sinalização, via RAS e que a exposição por longo tempo, a grandes concentrações de glicose, não provoca unicamente a diminuição da produção dos níveis de RNAm de XPD, como também aumenta o acúmulo de danos de DNA que podem levar ao câncer (Merckel *et al.*, 2003). Isto poderia ser explicado pelos resultados dos estudos de Blasiak *et al.* (2004), onde foi observada diminuição na eficácia do reparo de DNA em DM. Perfetti & Aggarwal (1999), também relataram que a mera presença de um receptor do tipo tirosina quinase (ex: RI, IGF1-R e EGF-R) aumenta a expressão da enzima de reparo XPD.

Trojanek (2003), relata que IRS1 (substrato de receptores de insulina 1), proteína que é fosforilada após a autofosforilação do receptor de insulina, interage com a proteína Rad 51, que apresenta homologia com a atividade recombinante de RecA em bactérias, enzima considerada chave para o HRR, em DNA. A falta de fosforilação de IRS1 impede sua ligação com Rad51, prejudicando seu deslocamento em direção ao núcleo, para exercer sua função no HRR do DNA. O receptor de IGF-1 é homólogo ao receptor de insulina. Sua ativação inicia uma cascata de sinalização envolvendo várias vias intracelulares como a PIK3 e da proteino-quinase ativada por mitógenos (MAPK). Héron-Milhavet *et al.* (2001, 2002), também relataram o papel direto do sistema IGF no reparo do DNA, através da via MAPK. Héron-Milhavet *et al.*, (2001), também demonstraram que a ativação de IGF-IR aumenta o reparo de DNA em fibroblastos. Somado a isto, Aloyz *et al.* (2002), demonstraram que a proteína XPD, pode exibir um efeito modulador na HRR demonstrando uma interação entre esses sistemas de reparo de DNA.

Estas observações acima, somadas as de que a MET age em receptores do tipo tirosina quinase, aumentando a fosforilação de IRS-1 e de IRS2 (Kumar & Dey, 2002 e Gunton, 2003), e que pacientes diabéticos, em uso de MET, apresentam menos risco de desenvolver alguns tipos de câncer (Jiralerspong *et al.*, 2009; Duncan & Schmidt, 2009), nos levaram a pensar em uma ação da MET, ainda não descrita, que seria de estimular enzimas de reparo de DNA de acordo com o esquema abaixo (figura 36). A MET, ao ativar receptores do tipo tirosina quinase, independente da presença de insulina, promove a autofosforilação do receptor e a fosforilação de substratos como IRS1 e IRS2. Estas fosforilações iniciam cascatas de reações, inclusive pela RAS, ativando a MAPK que, por ativar proteínas regulatórias de genes que controlam a expressão gênica, estaria aumentando a expressão da enzima XPD, participante do NER. Além disso, XPD apresenta um efeito modulador na HRR, por interagir com Rad51, enquanto IRS1 permite a migração de Rad51 para o núcleo, onde exercerá sua ação no HRR.

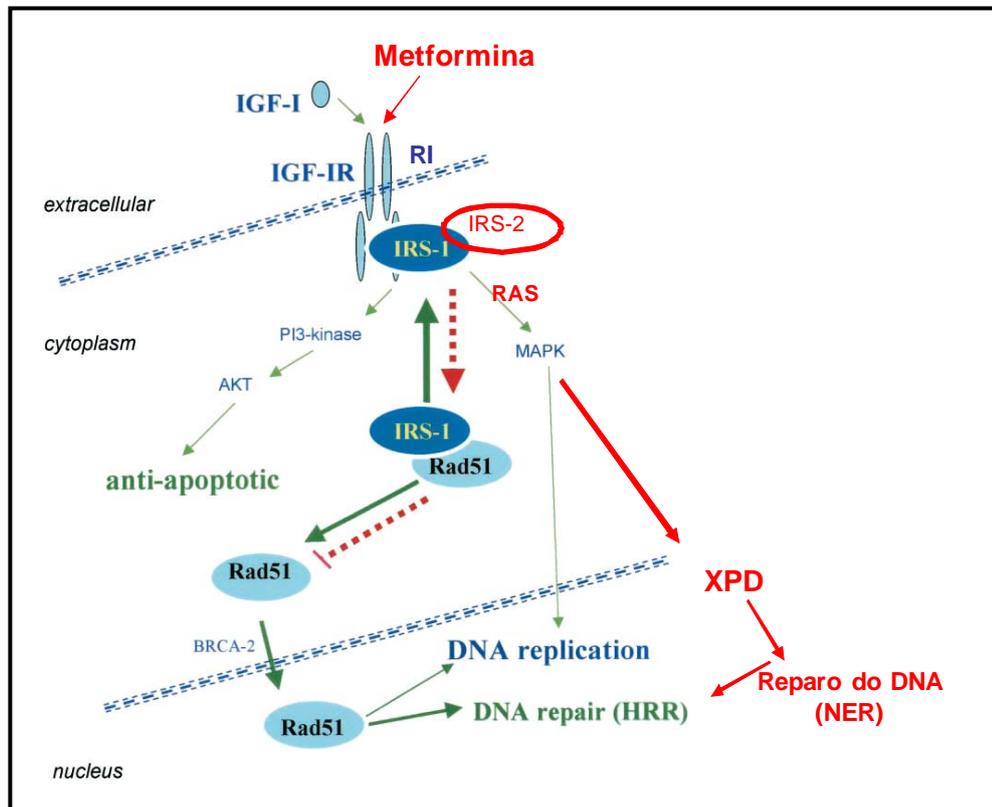


Figura 36: Ação da metformina em sistemas de reparo de DNA (Adaptado deTrojanek, 2003). Metformina agindo em receptores do tipo tirosina quinase, ativa IRS1 e IRS2 que ativam cascatas bioquímicas como a da via RAS-MAPK, promovendo sinalização para a regulação de expressão de genes como é o caso de XPD, que também pode se ligar a Rad 51 no núcleo na célula. Ainda assim, IRS1 estaria permitindo a migração de Rad 51 para o núcleo.

Em resumo, nossos resultados suportam a hipótese de que o aumento da resistência a lesões no DNA, na presença da MET, possa ser devido à ativação de sistemas de reparo através do estímulo de receptores do tipo tirosina quinase. No nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se descreve, na literatura, a interação entre uma droga anti-hiperglicemiante e sistemas de reparo de lesões no DNA. Estes resultados também contribuem para a compreensão do fato de pacientes diabéticos, submetidos ao tratamento com MET, terem uma menor probabilidade de desenvolver lesões no DNA e, conseqüentemente, processos patológicos relacionados a estas lesões, como o desenvolvimento de câncer.

CONCLUSÕES

Da análise dos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir:

1. Em procariotos:

- A MET induz proteção contra a ação da radiação UVC;
- Para exercer essa proteção, a MET necessita das proteínas UvrB (NER), *Fpg* (BER), e da atividade coproteolítica de RecA;
- A ação protetora da MET está associada a sua atuação em sistema de reparo, quando analisada a eletroforese em gel alcalino de agarose;
- A ação da MET envolve, possivelmente, a participação do sistema SOS;
- A proteção induzida pela MET ao DNA não se deve à sua ação antioxidante;

2. Em eucariotos:

- A MET induz proteção contra a ação da radiação UVC;
- A MET necessita da enzima de reparo XPD (NER), para exercer um papel protetor contra a ação deletéria do UVC;
- A presença da insulina, possivelmente, contribui para a ação da MET em proteger a célula contra a ação deletéria do UVC;
- A associação da MET com insulina promoveu um incremento na expressão do gene *BRCA1* quando se tratou células de adenocarcinoma de mama, transfectadas com este gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Bakheet SA, Al-Bekari AM, Al-Shabanah OA, Al-Majed A, Al-Yahya AA, Qureshi S. 2007. Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. *Mutat Res.* Jun 27.
- Aloyz R, Xu ZY, Bello V, Bergeron J, Han FY, Yan Y, Malapetsa A, Alaoui-Jamali MA, Duncan AM, Panasci L. 2002. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res.* Oct 1;62(19):5457-62.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP, **2002**. Inherited variants of *MYH* associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors *Nat Genet.* Feb;30(2):227-32. Epub 2002 Jan 30.
- Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semenchenko AV, Provinciali M, Re F, Freceschi C. 2005. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol.* Aug-Sep; 40(8-9):685-93.
- Armellini MG, Muotri AR, Marchetto MC, de Lima-Bessa KM, Sarasin A, Menck CF. 2005. Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther.* Apr;12(4):389-96.
- Bienstock RJ, Skovvaga M, Mandavilli BS, Van Houten B., 2003. Structural and functional characterization of the human DNA repair helicase XPD by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis of the bacterial repair protein UvrB. *J Biol Chem.* Feb 14;278(7):5309-16. Epub 2002 Nov 27.
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus *Mutat Res.* Oct 4;554(1-2):297-304.
- Boyce, R. P. e Howard- Flanders P., 1964. Release of ultraviolet- light- induced thymine dimmers from DNA in *E. coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 51: 293-300.
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Violet B, Thompson CB, 2007. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* Jul 15;67(14):6745-52.
- Carvalho H, da Costa RM, Chiganças V, Weinlich R, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CF., 2003. Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells. *Mutat Res.* Nov;544(2-3):159-66.

- Claudio, ILP, Efeito antigenotóxico da metformina no diabetes mellitus [dissertação de mestrado] Rio de Janeiro: UERJ, 2005.
- Costa RM, Chigancas V, Galhardo R da S, Carvalho H, Menck CF., 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.*;85(11):1083-99. Review.
- Cusi, K., De Fronzo, R.A., Metformina, a review of its metabolic effects. 1998; *Diabetes. Review*,6: 89-131.
- Czyzyk A, Szczepanik Z., 2000. Diabetes mellitus and cancer. *Eur J Intern Med.* Oct;11(5):245-252.
- D. Hoogstraten, S. Bergink, J.M.Y. Ng, V.H.M. Verbiest, M.S. Luijsterburg, B. Geverts, A. de Boer J, Hoeijmakers JH., 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* Mar; 21 (3): 453-60. Review.
- De Mattos J.C.P; Motta E.S., Oliveira M.B.N.; Dantas F.J.S.; Caldeira de Araújo A.; 2008. Alkaline Gel Electrophoresis Assay to Detect DNA Strand Breaks and Repair Mechanisms in *Escherichia coli*. 2008. *Brazilian Archives of Biology and Technology* vol51.
- Detaille, D., Guigas, B., Chauvin, C., Batandier, C., Fontaine, E., Wiernsperger, N., Leverve, X., 2005. Metformin Prevents High-Glucose-Induced Endothelial Cell Death Through a Mitochondrial Permeability Transition-Dependent Process. *Diabetes*, 54, 2179-2187.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* Feb;25(1):5-32. Epub 2008 Apr 22. Review.
- Doetsch PW, Cunningham RP., 1990. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res.* Sep-Nov;236(2-3):173-201. Review.
- Dominguez-Bendala J, Priddle H, Clarke A, McWhir J. 2003. Elevated expression of exogenous Rad51 leads to identical increases in gene-targeting frequency in murine embryonic stem (ES) cells with both functional and dysfunctional p53 genes. *Exp Cell Res.* Jun 10;286(2):298-307.
- Duncan BB, Schmidt MI. Metformin, cancer, alphabet soup, and the role of epidemiology in etiologic research. *Diabetes Care.* 2009 Sep;32(9):1748-50.
- EcoCyc (<http://EcoCyc.org>) 14 de Novembro de 2009.
- Erika P. Guedes., Rodrigo O Moreira, Alexander K. Benchimol. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* Jun 4;330(7503):1304-5. Epub 2005 Apr 22.
- Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A, 2007. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia.* Jul;50(7):1365-74. Epub May 3.

- Friedberg Errol C., Walker Graham C. and Wolfram Siede, 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington.
- Friedberg EC. 2001. Why do cells have multiple error-prone DNA polymerases? *Environ Mol Mutagen.*38(2-3):105-10. Review.
- Friedberg EC., DNA damage and repair. *Nature.* 2003 Jan, 23;421(6921):436-40. Review.
- Friedberg, EC., Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, e Ellenberger T., DNA repair and mutagenesis. 2006, Ed. ASM Press, Washington DC, USA- 2nd edition.
- Garber AJ, Duncan TG, Goodman AM, Mills DJ, Rohlf JL., Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *Am J Med.* 1997 Dec;103(6):491-7.
- http://www.genoma.ib.usp.br/.../doencas_xeroderma-pigmentoso.php
- Gil-del Valle L, Milian LC, Toledo A, Vilaró N, Tápanes R, Otero M.A, Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res.* 2005 Apr;51(4):375-80.
- Gillet LC, Schärer OD. 2006; Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* Feb;106(2):253-76. Review.
- Giovannucci E, Michaud D, The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology.* 2007 May;132(6):2208-25. Review.
- Gomez R, Mokhashi MH, Rao J, Vargas A, Compton T, McCarter R, Chalew SA., 2002. Metformin adjunctive therapy with insulin improves glycemic control in patients with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. *J. Pediatr. Endocrinol Metab.* 15, 1147-1151.
- Gossard F, Verly WG., 1978. Properties of the main endonuclease specific for apurinic sites of *Escherichia coli* (endonuclease VI). Mechanism of apurinic site excision from DNA. *Eur J Biochem.* Jan 16;82(2):321-32.
- Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Lerverve X., 2004. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J.* Sep 15;382(Pt 3):877-84.
- Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC., 2003. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab.* Mar;88(3):1323-32. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan;89(1):434.
- Hamilton, J., Cummings, E., Zdravkovic, V., Finegood, D., Daneman, D., 2003. Metformin as an adjunct therapy in adolescents with type 1 diabetes and insulin resistance: a randomized controlled trial. *Diabetes Care,* 26, 138-143.

- Hardie DG. 2007. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:185-210. Review.
- Héron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, Baum BJ, LeRoith D. 2001. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGF-I receptor in DNA repair. *J Biol Chem.* May 25;276(21):18185-92. Epub 2001 Mar 12.
- Héron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, Baum BJ, LeRoith D. 2002. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem.* May 3;277(18):15600-6.
- Hong SY, Jeon YM, Lee HJ, Kim JG, Baek JA, Lee JC., 2009. Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* Oct 2. [Epub ahead of print]
- Hoogstraten D, Bergink S, Ng JM, Verbiest VH, Luijsterburg MS, Geverts B, Raams A, Dinant C, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Houtsmuller AB. 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci.* Sep 1;121(Pt 17):2850-9.
- Jiralerspong S, Gonzalez Angulo AM, Hung MC. 2009. Expanding the arsenal: Metformin for the treatment of triple-negative breast cancer? *Cell Cycle* Sep 1;8(17).
- Johansen J S, Harris AK, Rychly D J, Ergul A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* Apr 29;4(1):5. Review.
- Khan M, Mori M, Fujino Y, Shibata A, Sakauchi F, Washio M, Tamakoshi A; 2006. Japan Collaborative Cohort Study Group, Site-specific cancer risk due to diabetes mellitus history: evidence from the Japan Collaborative Cohort (JACC) Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* Apr-Jun;7(2):253-9.
- Khoury H, Collin F, Bonnefont-Rousselot, D Legrand A, Jore D, Gardes-Albert M.. 2004. Radical-induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem.*, 271, 4745-4752.
- Kirpichnikov D, McFarlane SL, Sowers JR, 2002. Metformin: an update. *Ann Intern Med.*, 137, 25-33.
- Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. 2009. Metformin Disrupts Crosstalk between G Protein–Coupled Receptor and Insulin Receptor Signaling Systems and Inhibits Pancreatic Cancer Growth *Cancer Res.* Aug 15;69(16):6539-45.

- Kumar N, Dey CS. 2002. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol.* Oct;137(3):329-36.
- La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, D'Avanzo B and Boyle P, 1994. A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br J Cancer.* Nov;70(5):950-3.
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A, 2005. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* Nov 16;97(22):1679-87.
- Larsson SC, Orsini N, Brisman K, Wolk A. 2006, Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia.* Dec;49(12):2819-23.
- Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A, 2007. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* Aug 15;121(4):856-62.
- Lindsay JR, Duffy NA, McKillop AM, Ardill J, O'Harte FP, Flatt PR, Bell PM., 2005. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabet Med.* May;22(5):654-7.
- Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. 2007. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res.* Sep 14.
- Mannucci E, Tesi F, Bardini G, Ognibene A, Petracca MG, Ciani S, Pezzatini A, Brogi M, Dicembrini I, Cremasco F, Messeri G, Rotella CM., 2004. Effects of metformin on glucagon-like peptide-1 levels in obese patients with and without Type 2 diabetes. *Diabetes Nutr Metab.* Dec;17(6):336-42.
- McCall IC, Betanzos A, Weber DA, Nava P, Miller GW, Parkos CA., 2009. Effects of phenol on barrier function of a human intestinal epithelial cell line correlate with altered tight junction protein localization. *Toxicol Appl Pharmacol.* Aug 11.
- Memisoglu A, Samson L., 2000. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res.* Jun 30;451(1-2):39-51. Review.
- Merkel P, Khoury N, Bertolotto C, Perfetti R. 2003. Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD. *Mol Cell Endocrinol.* 28;201(1-2):75-85.
- Meyer L., Bohme, P., Delbachian I, Lehert P, Cugnardey N, Drouin P, Guerci B. 2003. The Benefits of Metformin Therapy During Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Treatment of Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 25, 2153-2158.
- Meyer L., Guerci B., 2003. Metformin and insulin in type 1 diabetes: the first step. *Diabetes Care,* 26, 1655-1656.
- Miychell DL., Nairn RS, 1989. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol.* Jun;49(6):805-19. Review.

- Murphy TM., 1975. Nucleic acids: interaction with solar UV radiation. *Curr Top Radiat Res Q.* Jun;10 (3):199-228. Review.
- Nospikel T., 2009. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.* Mar;66(6):994-1009. Review.
- Nowosielska A. *Acta Biochim* 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Pol.* 54(3):483-94. Epub Sep 23. Review.
- Ogunleye AA, Ogston SA, Morris AD, Evans JM.,2009. A cohort study of the risk of cancer associated with type 2 diabetes. *Br J Cancer.* Aug 18.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. *Radiat Res*, 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay *Apr*;122(1):86-94.
- Oliveira JEP, Milech A, *Diabetes Mellitus-Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar.* São Paulo: Atheneu, 2004.
- Ouslimani, N., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Legrand, A., Beaudoux, J.L., 2005. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 54, 829-34.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* Jun 15;348 Pt 3:607-14.
- Perfetti R, Aggarwal S., 1999. Signalling via receptor tyrosine kinase modulates the expression of the DNA repair enzyme XPD in cultured cells. *Mol Cell Endocrinol.* Nov 25;157(1-2):171-80.
- Pettijohn D, Hanawalt, 1964. Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *J Mol Biol.* Aug;9:395-410.
- Pfeifer GP., 1997. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol.* Feb;65(2):270-83. Review.
- Quillardet P., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res.* Jun: 147 (3):65-78.
- Raams, C. Dinant, J.H.J. Hoeijmakers, W. Vermeulen and A.B. Houtsmuller, 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC, *J. Cell Sci.* 121, 2850-2859.

- Radman M., 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.*;5A:355-67. Review.
- Radziuk J, Bailey CJ, Wiernsperger NF, Yudkin JS., 2003. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* Jun;3(2):151-69. Review.
- Rahbar S, Figarola JL., 2003. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys.* Nov 1;419(1):63-79. Review. PMID: 14568010.
- Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. 1997. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19;94(17):9463-8.
- Ren X, Zhang X, Zhang X, Gu W, Chen K, Le Y, Lai M, Zhu Y. 2009. Type 2 diabetes mellitus associated with increased risk for colorectal cancer: Evidence from an international ecological study and population-based risk analysis in China. *Public Health.* Aug 5.
- Ribeiro LR., Salvadori DMF., Marques EK. *Mutagênese Ambiental.* Canoas, 2003.
- Roos M., Claudio I.L.P.; Siqueira R. A., *Abordagem Farmacológica no Diabetes.* Rio de Janeiro: Rubio, 2009.
- Sakano K, Takahashi M, Mutoh M, Niho N, Komiya M, Sato H, Tanaka T, Sugimura T, Wakabayashi K., 2007. Enhanced thyroid carcinogenicity of N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of type II diabetes mellitus. *Carcinogenesis.* Oct;28(10):2193-8. Epub May 16.
- Sarnblad, S., Kroon, M., Aman, J. 2003; Metformin as additional therapy in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes: randomised placebo-controlled trial with aspects on insulin sensitivity. *Eur. J. Endocrinol.* 149, 323-329.
- Schärer OD., 2003. Chemistry and biology of DNA repair *Angew Chem Int Ed Engl.* Jul 7;42(26):2946-74. Review.
- Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ, Adrian TE, Pour PM. 2001. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology.* Apr;120 (5):1263-70.
- Sekiva M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Ishibashi S, Nagai R, Yamazaki T, Kadowaki T, Yamada N, Osuga J, Shimano H., 2007. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res.* Jul;48(7):1581-91.

- Seltlow, R. B., Carrier, W. L., 1963. Topography and kinetics of genetic recombination in *Escherichia coli* treated with psoralen and light: effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism. *J. Bacteriol.*, 136: 538-547.
- Svobodova A, Walterova D, Vostalova J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* Jul;150(1):25-38. Review.
- Thomas DC, Kunkel TA. 1993. Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts: evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 15;90(16):7744-8.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*;35(3):206-21.
- Trojanek J, Ho T, Del Valle L, Nowicki M, Wang JY, Lassak A, Peruzzi F, Khalili K, Skorski T, Reiss K, 2003. Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination. *Mol Cell Biol.* Nov;23(21):7510-24.
- Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C. 2006, Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev.* Feb;106(2):233-52. Review.
- Uchida A, Sugasawa K, Masutani C, Dohmae N, Araki M, Yokoi M, Ohkuma Y, Hanaoka F. 2002. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Repair (Amst).* Jun 21;1(6):449-61
- Van der Leun JC., 1996. UV radiation from sunlight: summary, conclusions and recommendations. *J Photochem Photobiol B.*, Sep;35(3):237-44.
- Washio M, Mori M, Khan M, Sakauchi F, Watanabe Y, Ozasa K, Hayashi K, Miki T, Nakao M, Mikami K, Ito Y, Kubo T, Wakai K, Tamakoshi A; 2007. The JACC Study Group. Diabetes mellitus and kidney cancer risk: the results of Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk (JACC Study). *Int J Urol.* May;14(5):393-7.
- Wielgus AR, Zhao B, Chignell CF, Hu DN, Roberts JE., 2009. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* Oct 1. [Epub ahead of print]
- Wright JL, Stanford JL. 2009. Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* Aug 4.
- Yoon JH, Lee CS, O' Connor TR, Yasui A, Pfeifer GP., 2000. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J Mol Biol.* Jun 9;299(3):681-93.

- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. 2006. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10269-73. Epub Oct 23.
- Zendehdel K, Nyrén O, Ostenson CG, Adami HO, Ekblom A, Ye W, 2003. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *J Natl Cancer Inst.* Dec 3;95(23):1797-800.
- Zivaljevic V., Vlajinac H., Jankovic R., Marinkovic J., Diklic A. and Paunovic I., 2004. Case-control study of anaplastic thyroid cancer. *Tumori.* Jan-Feb;90(1):9-12.
- Zhou BB, Elledge SJ., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* Nov 23;408(6811):433-9. Review.

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](#)