



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÔMICA**

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA XPA EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM AZUL DE METILENO FOTOSSENSIBILIZADO**

Acarízia Eduardo da Silva

**Natal-RN
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Modulação da Expressão da Proteína XPA em Resposta ao Tratamento com
Azul de Metileno Fotossensibilizado**

por

Acarízia Eduardo da Silva

Dissertação Apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, Como Requisito Parcial à Obtenção
do Título de Mestre no Programa de Pós-
graduação em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucymara Fassarella Agnez Lima.

Natal-RN

2010

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos, a quem amo,
pela compreensão, amor e apoio
em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- A minha orientadora, Prof^a Dr^a Lucymara Fassarella Agnez Lima, pela confiança, apoio e inspiração;
- A Amanda, Ana Helena, Angélica e Juliana pelos momentos de diversão e pela amizade, carinho e incentivo;
- A Ana Rafaela, em especial, pela grande contribuição e ajuda nesse trabalho;
- A Ralfo e Abinadabe pela demonstração de amizade,
- A Gideão pela grande ajuda,
- Às professoras e amigos do LBMG e
- A Capes e ao CNPq pelo financiamento do projeto

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante o metabolismo aeróbico e são capazes de reagir com diversas biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. Dentre as ERO, o oxigênio singlete (1O_2) é conhecido como um dos principais agentes envolvidos no estresse oxidativo. A exposição de alguns pigmentos, como o azul de metileno (MB) à luz é capaz de gerar 1O_2 , sendo essa a base da terapia fotodinâmica (TFD). Quando em excesso, o 1O_2 e outras ERO mostram efeitos tóxicos e carcinogênicos e estão relacionados ao envelhecimento e à etiologia de várias doenças, incluindo artrite, doenças degenerativas e câncer. A principal via de reparo de danos oxidativos ao DNA é a via por excisão de base (BER). No entanto, estudos recentes têm observado a atuação de fatores da via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) na correção desse tipo de lesão. Um dos fatores da via NER é a proteína Xeroderma Pigmentoso do Grupo de complementação A (XPA), que atua em conjunto com outras proteínas na etapa de localização dos sítios de danos e de recrutamento de outros fatores de reparo. Ainda, agentes oxidativos como o 1O_2 são capazes de induzir a expressão gênica. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a resposta de células deficientes em XPA ao tratamento com MB fotossensibilizado. Para isso, foram analisadas a viabilidade celular e a ocorrência de danos oxidativos em linhagens proficientes e deficientes em XPA, assim como a expressão dessa enzima em células proficientes e complementadas. Nossos resultados indicam um aumento da resistência ao tratamento em células complementadas com XPA e um maior nível de danos oxidativos em linhagens deficientes nessa enzima. Além disso, o tratamento foi responsável pela modulação da expressão dessa enzima até 24h depois. Esses resultados indicam uma evidência direta da participação de enzimas do NER no reparo de danos oxidativos e contribui para um melhor entendimento sobre os efeitos da TFD na indução da expressão gênica.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, azul de metileno, oxigênio singlete, reparo de DNA, XPA.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are produced by aerobic metabolism and react with biomolecules, such as lipids, proteins and DNA. In high concentration, they lead to oxidative stress. Among ROS, singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is one of the main ROS involved in oxidative stress and is one of the most reactive forms of molecular oxygen. The exposure of some dyes, such as methylene blue (MB) to light (MB+VL), is able to generate $^1\text{O}_2$ and it is the principle involved in photodynamic therapy (PDT). $^1\text{O}_2$ e other ROS have caused toxic and carcinogenic effects and have been associated with ageing, neurodegenerative diseases and cancer. Oxidative DNA damage is mainly repaired by base excision repair (BER) pathway. However, recent studies have observed the involvement of nucleotide excision repair (NER) factors in the repair of this type of injury. One of these factors is the Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A (XPA) protein, which acts with other proteins in DNA damage recognition and in the recruitment of other repair factors. Moreover, oxidative agents such as $^1\text{O}_2$ can induce gene expression. In this context, this study aimed at evaluating the response of XPA-deficient cells after treatment with photosensitized MB. For this purpose, we analyzed the cell viability and occurrence of oxidative DNA damage in cells lines proficient and deficient in XPA after treatment with MB+VL, and evaluated the expression of this enzyme in proficient and complemented cells. Our results indicate an increased resistance to treatment of complemented cells and a higher level of oxidative damage in the deficient cell lines. Furthermore, the treatment was able to modulate the XPA expression up to 24 hours later. These results indicate a direct evidence for the involvement of NER enzymes in the repair of oxidative damage. Besides, a better understanding of the effects of PDT on the induction of gene expression could be provided.

Keywords: Oxidative stress. Methylene blue. Singlet oxygen. DNA repair. XPA.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1 – Espécies reativas de oxigênio	1
1.2 – Oxigênio singlete	3
1.2.1 – Formação do oxigênio singlete	6
1.3 – Azul de Metileno	8
1.4 – Danos oxidativos no DNA	11
1.5 – Reparo por excisão de base	15
1.6 – Reparo por excisão de nucleotídeo.....	17
1.7 – Fator de reparo Xeroderma Pigmentoso – grupo de complementação A (XPA).....	21
2 – OBJETIVO GERAL	24
2.1 – Objetivos específicos	24
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 – Linhagens celulares	25
3.2 – Tratamento com MB.....	25
3.3 – Fotoativação do azul de metileno.....	25
3.4 – Viabilidade celular	26
3.5 – Quantificação de danos oxidativos no DNA (8-oxoG)	26
3.6 – Imunofluorescência	27
3.7 - <i>Immunoblotting</i>	27
4- RESULTADOS	27
5 – DISCUSSÃO	34
6 - CONCLUSÃO	40
7 – REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Conseqüências do $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização na célula	5
Figura 02 – Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares do oxigênio em sua forma singlete e triplete	6
Figura 03 – Fórmula estrutural do azul de metileno	7
Figura 04 – Fotoativação do azul de metileno	8
Figura 05 – Estrutura de pares de bases contendo a 8-oxoG e diferentes produtos de sua oxidação	12
Figura 06 – Produtos da oxidação da Guanina	13
Figura 07 – Produtos gerados pela oxidação da 8-oxoG por $^1\text{O}_2$	14
Figura 08 – Subvias do reparo por excisão de bases	16
Figura 09 – Modelo da via de reparo por excisão de nucleotídeo	18
Figura 10 – Localização das mutações no gene XPA	21
Figura 11 – Confirmação da deficiência de XPA nas linhagens utilizadas e viabilidade celular após tratamento	25
Figura 12 – Formação de 8-oxoG após tratamento	27
Figura 13 – Análise da expressão de XPA por <i>immunoblotting</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas envolvidas no reparo de 8-oxoG	21
Tabela 2 - Mutações em <i>xpa</i> já caracterizadas em amostras de pacientes ..	32

LISTA DE ABREVIATURAS

μM = Micromolar
8-oxoG = 7,8-dihidro-8-oxoguanina
5'dRP = 5'-fosfato-desoxirribose
A = Adenina
AP = apurínico/apirimidínico
AP-1 = Proteína Ativadora 1
BER = Reparo por Excisão de Base
C = Citosina
CS = Síndrome de Cockayne
DNA = Ácido desoxirribonucléico
ERO = Espécies Reativas de Oxigênio
FEN1 = Flap endonuclease 1
FITC = Isotiocianato de fluoresceína
G = Guanina
GG-NER = NER genômico global
IDPc = Isocitrato desidrogenase NADP(+)-dependente
Iz = 2-aminoimidazolona
kcal = Quilocalorias
MB = Azul de Metileno
MB+VL = Azul de Metileno +Luz visível
NF-κB = Fator Nuclear κB
nm = nanômetro
NER = Reparo por Excisão de Nucleotídeos
Oz = oxazolona
PBSA = Solução Tampão Fosfato Salina
PCNA = Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PVDF = Difluoreto de Polivinilideno
RFC = Fator de Replicação C
RNA = Ácido ribonucléico
SBF = Soro Fetal Bovino

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SOD = Superóxido Dismutase

Sp = espiroiminodihidantoina

T = Timina

TBST = Tampão Salino contendo TRIS e Tween 20

TC-NER = NER acoplado à transcrição

TFD = Terapia Fotodinâmica

UV = Ultra-Violeta

XP = Xeroderma Pigmentoso

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio é um composto indispensável para a produção de energia, tanto nos animais como nas plantas. Exceto os organismos que são adaptados para viver sob condições anaeróbicas, todos os seres vivos requerem oxigênio para seu metabolismo. No entanto, embora seja indispensável à vida, pode também ocasionar danos aos organismos, reversíveis ou não, podendo levar até mesmo à morte celular.

Devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio está sujeito ao ganho de elétrons, tornando-se, assim, um potente oxidante. O oxigênio molecular (O_2) possui sua reatividade limitada devido a sua cinética. No entanto, durante o processo de respiração, o O_2 é progressivamente reduzido e essa redução incompleta leva a formação de moléculas potencialmente oxidantes, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO) (Morel e Barouki, 1999).

As ERO, que incluem espécies de oxigênio reduzidas parcialmente, isto é, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são geradas endogenamente como subprodutos da respiração e também durante estados patológicos por neutrófilos ativados (Ramana, Boldogh *et al.*, 1998).

Sob condições fisiológicas normais, uma pequena fração do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertida constantemente em ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e outras ERO. Apesar das ERO possuírem um importante papel na regulação de muitas funções celulares, participando da transdução de sinais e ativando fatores de transcrição específicos, como NF- κ B e AP-1 (Dalton, Shertzer *et al.*, 1999), a produção excessiva de ERO pode causar efeitos deletérios, sendo essencial a atuação de mecanismos contra essas condições.

Dentre esses mecanismos estão os sistemas de defesa antioxidantes das células, responsáveis pelo controle dos níveis de ERO, seja transformando um radical livre em outro menos reativo, neutralizando sua ação ou promovendo o aumento da geração de antioxidantes endógenos. Diversas enzimas fazem parte desses sistemas e são responsáveis pela detoxicação das ERO, como a catalase,

envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a superóxido dismutase (SOD), que participa da eliminação de superóxido. Outras enzimas, incluindo a quinona redutase e a heme oxigenase, podem prevenir a formação de radicais derivados do oxigênio. Essas enzimas são induzidas como parte da resposta ao estresse oxidativo (Morel e Barouki, 1999).

Dessa forma, o estresse oxidativo acontece quando a homeostase do estado redox da célula é alterado. Este desequilíbrio pode ocorrer devido a uma superprodução de ERO ou a uma deficiência no sistema antioxidante celular (Buonocore e Groenendaal, 2007). Assim, o desbalanço entre a produção de ERO e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo, que se caracteriza por uma condição celular ou fisiológica, em que a elevada concentração de ERO causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional (Dröge, 2002), o que pode afetar diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecidos adiposo (Barja De Quiroga, 1992), vascular (Duarte, Appell *et al.*, 1993; Fenster, Weinsier *et al.*, 2002) e cerebral (Halliwell, 1994; Keynes e Garthwaite, 2004). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (Niess, Dickhuth *et al.*, 1999). Mais ainda, pode variar entre tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada (Berra e Menck, 2006).

A exposição prolongada a condições oxidativas leva ao acúmulo de danos ao DNA, possivelmente levando a mutações. O estresse oxidativo crônico pode reprimir a expressão gênica pela alteração da atividade de fatores de transcrição ou pela modificação da região promotora do gene. Além disso, também é possível que ocorra a oxidação de proteínas reguladoras de RNA (Morel e Barouki, 1999), responsáveis pela modulação da expressão gênica em resposta a fatores extracelulares (Lasko, 2003). Alterações oxidativas de nucleotídeo de RNA (Taddei, Hayakawa *et al.*, 1997) também podem ser deletérias para a expressão de proteínas.

Acredita-se que os níveis basais de alterações oxidativas no DNA contribuem para a instabilidade genética das células e estão envolvidos na carcinogênese espontânea, no envelhecimento e na patogênese de diversas doenças

degenerativas relacionadas à idade, incluindo artrite, câncer e doenças neurodegenerativas (Harman, 1992; Papaconstantinou, 1994; Beckman e Ames, 1999).

A maioria das ERO produzidas endogenamente é derivada da cadeia de transporte de elétrons. Estima-se que 1-5% do oxigênio consumido pelas células sejam capazes de formarem ERO (Chance, Sies *et al.*, 1979). Somada à produção endógena, ERO podem ser produzidas por fatores exógenos, como radiação ionizante, dieta e xenobióticos (Davies, 1987; Kolachana, Subrahmanyam *et al.*, 1993). Também estão associados à produção de ERO, hábitos de vida inadequados, como o consumo de álcool, o fumo e uma dieta inapropriada. Estados psicológicos que provocam estresse emocional também contribuem para a produção de ERO (Elsayed, 2001). Além disso, o envelhecimento (Dröge, 2002) e o exercício físico realizado de forma extrema (Elsayed, 2001) também estão associados ao estresse oxidativo.

Apesar de sua relevância patofisiológica, há pouca informação sobre as fontes endógenas de ERO responsáveis pelos danos oxidativos ao DNA (Hoffmann, Spitkovsky *et al.*, 2004). Prováveis candidatos são enzimas que metabolizam o oxigênio nas proximidades do DNA nuclear, por exemplo, lipoxigenases, NAD(P)H oxidases, xantina oxidases e citocromos, que estão localizados na membrana do núcleo (Peskin, Konstantinov *et al.*, 1987), embora não se tenham, ainda, estudos conclusivos.

A ação de ERO sobre as bases do DNA causam danos tanto no DNA genômico como no mitocondrial (Beckman e Ames, 1999; Stief, 2003), tendo sido, portanto, objeto de estudo de muitas pesquisas.

1.2. OXIGÊNIO SINGLETE

As principais espécies reativas de oxigênio são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido, radical hidroxila e o oxigênio singlete (Snyder, Skovsen *et al.*, 2005), sendo este a forma mais reativa do oxigênio molecular (Kim, 2002).

Dentre as ERO, o oxigênio singlete (1O_2) tem se destacado como um importante oxidante biológico por apresentar propriedades únicas e reatividade extremamente alta com componentes biológicos, tais como proteínas, lipídios e

DNA. Modificações nessas estruturas podem ser deletérias à célula por gerarem uma perda na função de membranas e proteínas, bloquear a replicação do material genético ou, ainda, causar mutações. A oxidação por $^1\text{O}_2$ de alvos biológicos como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos pode levar à morte celular, embora durante uma resposta inflamatória essa toxicidade seja benéfica ao organismo por defendê-lo contra microorganismos (Grune, Klotz *et al.*, 2001).

O $^1\text{O}_2$ possui características exclusivas por ser a única espécie reativa de oxigênio não-radical, que está em estado eletronicamente excitado, sendo altamente eletrofílica. Assim, o $^1\text{O}_2$ induz um processo de oxidação característico, atacando diretamente componentes orgânicos em suas zonas ricas em elétrons sem o envolvimento de radicais livres (Oh, Jang *et al.*, 2006).

Sabe-se que o $^1\text{O}_2$ pode ser gerado nas células sob condições de estresse oxidativo (Sies, 1986), pela decomposição de peróxidos lipídicos ou pela dismutação espontânea do superóxido (Foote, 1971; Krinsky, 1974). Algumas evidências têm sido apresentadas para a formação de $^1\text{O}_2$ por diversas enzimas como peroxidases (*e.g.* myeloperoxidase (Kanofsky, 1984), lactoperoxidase (Kanofsky, 1983), horseradish peroxidase (Kanofsky, 1988), cloroperoxidase (Kanofsky, 1984) e lipoxigenases (Kanofsky e Axelrod, 1986). Acredita-se que alguns tipos celulares, como eosinófilos, macrófagos e neutrófilos (Steinbeck, Khan *et al.*, 1993; Teixeira, Cunha *et al.*, 1999), quando estimulados são capazes de gerar este oxidante durante a resposta inflamatória (Teixeira, Cunha *et al.*, 1999), possivelmente como resultado da presença das enzimas citadas acima. O $^1\text{O}_2$ também é produzido em reações envolvendo ozônio e durante a reação de H_2O_2 com ácido hipocloroso (Foote e Wexler, 1964) ou peroxinitrito (Di Mascio, Bechara *et al.*, 1994).

As células contêm uma variedade de moléculas que podem servir como substrato para a oxidação por $^1\text{O}_2$. Os aminoácidos metionina, histidina, cisteína, tirosina e triptofano reagem comumente com o $^1\text{O}_2$ em taxas constantes (Davies, 2004). Estas taxas e a alta concentração de proteínas nas células sugerem que essa é a principal classe de biomoléculas capaz de reagir com $^1\text{O}_2$ em todos os compartimentos celulares (Figura 1). Apesar de menos abundantes que proteínas, os ácidos graxos insaturados também constituem um significativo substrato para o $^1\text{O}_2$ formado próximo às membranas. Ácidos nucleicos também são oxidados por $^1\text{O}_2$, sendo a guanina a base mais reativa (Ravanat, Sauvaigo *et al.*, 2004), uma vez

que esta possui um baixo potencial redox (Neeley e Essigmann, 2006). Desse modo, modificações oxidativas na guanina são os principais danos gerados por aparentemente todos os tipos de espécies reativas de oxigênio.

A oxidação dessa base pelo $^1\text{O}_2$ tem atraído interesse e vem sendo foco de diversas pesquisas devido a sua importância na etiologia do câncer e na sua cura, através da terapia fotodinâmica (TFD) (Ravanat e Cadet, 1995; Ahmad e Mukhtar, 2000). Mesmo o $^1\text{O}_2$ gerado no citoplasma, quando não interceptado por algum seqüestrador biológico (Dahl, Midden *et al.*, 1988), parece ser capaz de reagir com o DNA nuclear. Em todo caso, a oxidação de todas as biomoléculas pode levar a diferentes respostas biológicas.

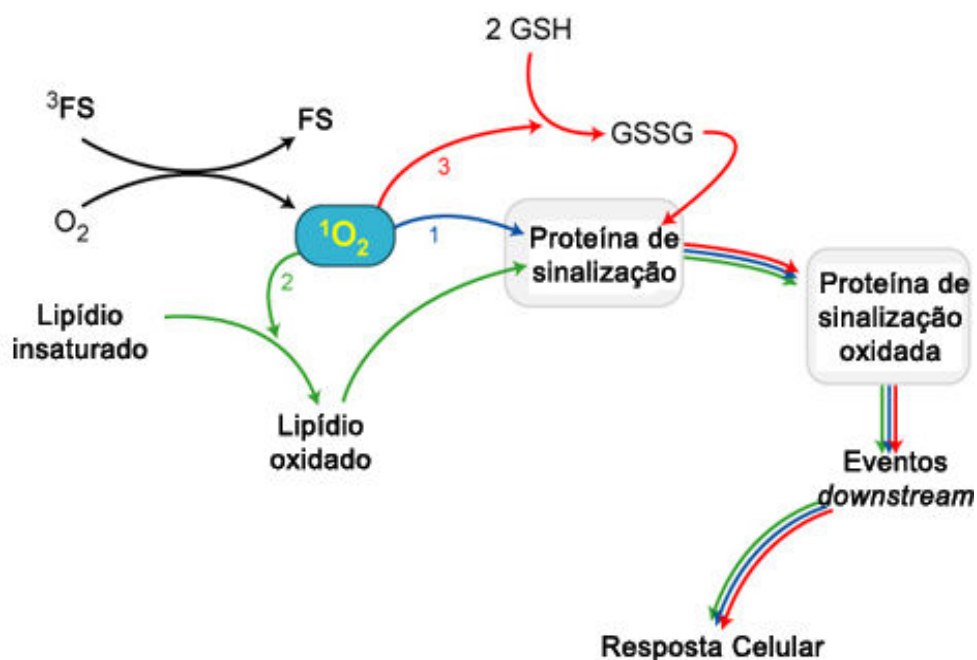


Figura 1. O $^1\text{O}_2$ gerado pela ativação de um fotossensibilizador (FS) na presença de oxigênio pode oxidar uma proteína sinalizadora diretamente (1), oxidar lipídios insaturados, gerando produtos que interagem com a proteína (2) ou alterar o equilíbrio redox da célula pela oxidação da glutatona (3) [Adaptada de Kochevar, 2004].

O $^1\text{O}_2$ é capaz de induzir efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Epe, 1991; Sies e Menck, 1992). A oxidação de componentes biológicos induzida por esta espécie reativa está associada a várias patologias, como catarata, envelhecimento da pele e câncer (Davies e Goldberg, 1987; Meucci, Mordente *et al.*, 1991). Em contraste com ERO, como peróxidos, superóxido e H_2O_2 ,

que são removidos pela glutathione peroxidase, SOD e catalase, respectivamente, para o $^1\text{O}_2$ não são conhecidos sistemas específicos de eliminação deste agente, o que tem sido atribuído ao seu baixo tempo de vida, não se caracterizando como pressão seletiva para evolução de sistemas de defesa específicos (Redmond e Kochevar, 2006). Além disso, antioxidantes químicos que interceptem o $^1\text{O}_2$ devem estar em concentração elevada ou próximos ao seu sítio de geração para que sejam efetivos, devido ao seu curto tempo de vida no estado excitado (Frank e Cogdell, 1996; Sharma, Panico *et al.*, 1997).

Recentemente, foi sugerido o envolvimento da isocitrato desidrogenase NADP(+)-dependente (IDPc) na resposta de proteção aos danos causados por oxigênio singlete, provavelmente por sua atuação como enzima antioxidante (Kim, Lee *et al.*, 2007), embora seja também um provável alvo de oxidação do $^1\text{O}_2$, o que provoca sua inativação (Kim, Tak *et al.*, 2004).

1.2.1. Formação do Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular em seu estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$) apresenta seu nível eletrônico de energia mais alta constituído por dois orbitais degenerados π^* ocupados por dois elétrons. Cada elétron se encontra em um orbital com spins paralelos, constituindo um biradical, denotado por $^3\text{O}_2$ (Martinez, Medeiros *et al.*, 2000). Esta característica conferiria ao oxigênio uma alta reatividade, entretanto sua redução direta por dois elétrons com spins antiparalelos não é permitida pela regra de conservação de spin, tornando-o relativamente inerte. O oxigênio no estado excitado pode apresentar-se sob duas formas: $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$, a primeira com energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (2-4 μs em H_2O), e a segunda com energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$ (Martinez, Medeiros *et al.*, 2000) (Figura 2).

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)
$1\Sigma_g^+$	$\uparrow \downarrow$	37,5
$1\Delta_g$	$\uparrow \downarrow$	22,5
$3\Sigma_g^-$	$\uparrow \uparrow$	

Figura 2 – Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado singlete ($1\Delta_g, 1\Sigma_g^+$) e no estado fundamental triplete ($3\Sigma_g^-$) (Martinez; Medeiros; Di Mascio, 2000).

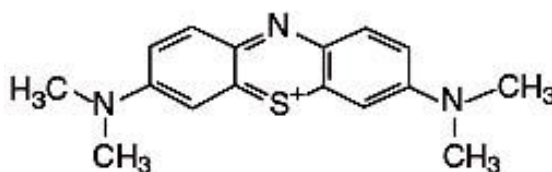
Portanto, o 1O_2 ($1\Delta_g$) é o estado eletrônico de menor excitação do oxigênio molecular (Snyder, Skovsen *et al.*, 2005), resultado da elevação de um elétron para um orbital de maior energia (Kim, 2002). É produzido por células sob condições normais ou patofisiológicas (Kanofsky, 1989), atuando como um sinalizador e um mecanismo de defesa contra múltiplos patógenos – incluindo microorganismos, vírus, células tumorais e trombos, resultando na ativação da resposta inflamatória (Snyder, Skovsen *et al.*, 2005). Entretanto, em concentração excessiva, assim como outras ERO, apresenta ação carcinogênica e tóxica sobre alguns tecidos.

Apesar do grande número de reações não-fotoquímicas gerarem 1O_2 , como as já citadas, a fonte mais comum em sistemas biológicos é provavelmente a exposição à UV ou luz visível na presença de um fotossensibilizador apropriado (Davies, 2004), sendo, portanto, um importante agente citotóxico envolvido na morte celular fotoinduzida na presença de O_2 (Snyder, Skovsen *et al.*, 2005).

Como visto por Tyrrel e Pidoux, a geração de 1O_2 possui um importante papel na inativação de células humanas em cultura por UVA e radiações próximas à luz visível. Ainda, conforme revisado por Wei *et al* (1997), tanto UVC como UVB são capazes de gerar 1O_2 a partir da irradiação direta de dG.

1.3. AZUL DE METILENO

O azul de metileno (MB), nome químico “3,7-bis(dimethylamino)phenothiazine-5-ium chloride” (Figura 3), é um corante catiônico pertencente a classe das tiazinas. Foi sintetizado primeiramente em 1876 e tem sido amplamente utilizado como um corante biológico. Entretanto, o MB possui ainda efeitos fisiológicos interessantes e complexos atribuídos a sua propriedade redox, que favorece a formação de produtos intermediários de oxidação. As propriedades fotoquímicas do MB têm sido estudadas em sistemas químicos, sendo seus princípios a base para o entendimento da ação do MB na maioria dos sistemas biológicos.



Azul de Metileno

Figura 3 – Fórmula estrutural do Azul de Metileno.

Na presença de oxigênio, a combinação da luz visível com um fotossensibilizador provoca a geração de $^1\text{O}_2$ e outras ERO, como ânions superóxido e radicais hidroxila (Sobolev, Jans *et al.*, 2000). Corantes como o rosa bengala, a eosina e o MB são fotossensibilizadores efetivos por possuírem estado triplete com energia suficiente para a sensibilização do oxigênio (Derosa e Crutchley, 2002).

A Figura 4 mostra as reações envolvidas durante a fotoativação do MB. A luz provoca a alteração da molécula do MB em seu estado fundamental para um estado singlete excitado (^1MB), que pode voltar para seu estado fundamental ou passar para um estado triplete excitado (^3MB). O estado triplete pode decair lentamente para seu estado fundamental ou participar de reações do tipo I ou II. Reações do tipo II ocorrem na presença de oxigênio. A reação mais rápida do tipo II é a formação de $^1\text{O}_2$, na presença de oxigênio, e o retorno do MB ao seu estado fundamental. O estado triplete do MB também pode reagir com o oxigênio para formar superóxido,

entretanto, sua formação acontece em uma taxa muito mais baixa que a formação do $^1\text{O}_2$. O estado triplete do MB também é capaz de reagir com um substrato ou solvente para permitir a transferência de um átomo de H ou elétron, caracterizando a reação do tipo I (Floyd, Schneider *et al.*, 2004).

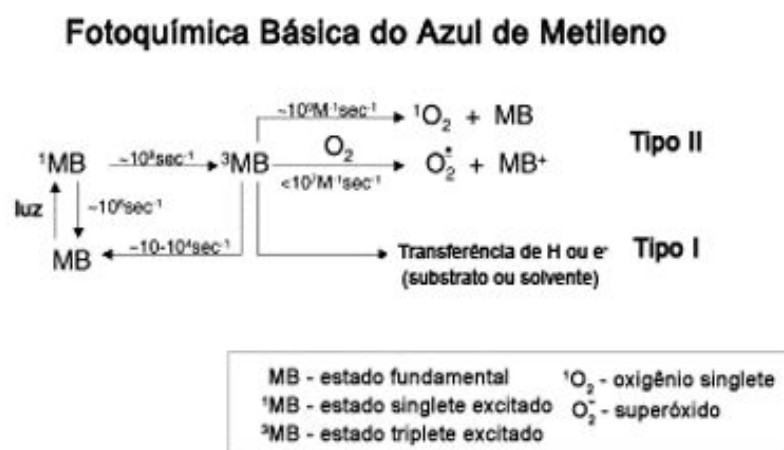


Figura 4 – Fotoativação do Azul de Metileno (figura adaptada de Floyd *et al.*, 2004).

Sabe-se que o MB possui a propriedade de se ligar fortemente ao DNA, especificamente em regiões ricas em G-C. Também já foi descrito que o MB, na presença da luz, provoca a quebra de fitas de ácidos nucleicos (Cadet, Berger *et al.*, 1986; Ohuigin, Mcconnell *et al.*, 1987; Muller, Boiteux *et al.*, 1990) e que o $^1\text{O}_2$ é um importante intermediário desse processo, reagindo preferencialmente com a guanina e produzindo diferentes produtos de oxidação (Cadet, Decarroz *et al.*, 1983). Gutter e colaboradores mostraram que o MB induz a foto-oxidação de resíduos de guanina no DNA de células KB humanas (Gutter, Nishioka *et al.*, 1976).

O $^1\text{O}_2$ e o radical hidroxila, as espécies mais reativas geradas fotodinamicamente, possuem tempos de vida extremamente curtos no ambiente intracelular, e sua área de influência é bastante pequena, não mais do que 20 nm do sítio de geração (Sobolev, Jans *et al.*, 2000). Entretanto, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ e de outras ERO não se refere à sua completa ausência, mas indica o tempo em que sua concentração diminui para 37% da concentração original. Isso significa que após três tempos de vida, 5% do $^1\text{O}_2$ ainda permanecem se difundindo na célula. É possível que mesmo um nível reduzido de $^1\text{O}_2$ ao oxidar um alvo apropriado seja capaz de

iniciar uma resposta (Redmond e Kochevar, 2006). Desse modo, a localização intracelular do fotossensibilizador determina a área de sua ação e os alvos moleculares de oxidação (Oleinick e Evans, 1998; Niedre, Patterson *et al.*, 2002). Conseqüentemente, o $^1\text{O}_2$ pode reagir somente diretamente com moléculas que estejam próximas à localização do fotossensibilizador (Kochevar, 2004).

A localização exata do MB em cultura celular ainda não está clara, sendo alvo de controvérsias na literatura. Por exemplo, o lisossomo é um sítio de localização e ação do MB. Santus e colaboradores (1983) mostraram que o MB é capaz de liberar enzimas lisossomais em fibroblastos humanos durante sua iluminação com luz visível (Santus, Kohen *et al.*, 1983). Também foi observada sua localização na mitocôndria (Rashid e Horobin, 1990). Alguns autores, entretanto, sugerem que o MB estaria localizado no lisossomo e que haveria migração para o núcleo sob iluminação (Rück, Köllner *et al.*, 1992). Outros autores demonstraram que o núcleo seria sua principal localização (Yu, Chang *et al.*, 1993). A provável razão para essa discrepância pode estar no fato do microambiente afetar as propriedades do MB (eficiência de emissão) e impedir a determinação exata de sua localização por microscopia de fluorescência (Tardivo, Giglio *et al.*, 2005).

A fotoquímica de fenotiazinas no núcleo tem sido investigada por vários grupos, principalmente na área de interações ácidos nucléicos-MB (Tuite e Kelly, 1993). A produção fotoquímica artificial de $^1\text{O}_2$ e outras ERO é utilizada para destruir células e tecidos tumorais, através de um processo denominado terapia fotodinâmica (Ryter e Tyrrell, 1998). Quando iluminado, o MB intercalado provoca a formação de resíduos de guanina oxidados por intermédio do oxigênio singlete, principalmente a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), (Wainwright, Phoenix *et al.*, 1997). O azul de metileno na presença da luz já mostrou causar danos oxidativos à guanina, levando a quebras de fita simples do DNA e sítios álcali-lábeis em uma linhagem celular de leucemia mielóide humana, K562 (Mcnair, Marples *et al.*, 1997).

A interação do $^1\text{O}_2$ com o DNA é capaz de provocar modificações que podem ser reconhecidas por proteínas específicas, tanto para o reparo do DNA como para regulação de processos de sinalização dependentes desses danos (Grune, Klotz *et al.*, 2001). A 8-oxoG é o principal dano induzido por espécies reativas de oxigênio causado a bases do DNA e é freqüentemente utilizado como um indicador de estresse oxidativo na célula (Melvin, Cunniff *et al.*, 1998).

1.4. DANOS OXIDATIVOS NO DNA

Os pares de bases de DNA, A:T e G:C, são cruciais para a preservação da informação contida no genoma. No entanto, as propriedades estruturais das bases do DNA e, conseqüentemente, as propriedades desse emparelhamento podem ser modificadas por reações envolvendo agentes ambientais, como radiação UV, e por produtos ou subprodutos metabólicos endógenos, como as ERO (David, O'shea *et al.*, 2007), comprometendo a integridade funcional do genoma. Estima-se que as células de mamíferos estejam sujeitas a pelo menos 10.000 lesões diferentes a cada dia, o que pode, entretanto, estar subestimado (Ataian e Krebs, 2006). Apesar de vários agentes danosos ao DNA estarem presentes no meio ambiente, a maioria dos danos é de origem endógena e deve-se principalmente a: (i) oxidação do DNA por ERO geradas normalmente pelo metabolismo das células; (ii) desaminação espontânea de bases do DNA, e (iii) metilação de bases por S-adenosilmetionina (Fortini, Pascucci *et al.*, 2003). Lesões oxidativas constituem o principal dano endógeno que ocorre no genoma de todos os organismos aeróbicos (Mitra, Izumi *et al.*, 2007).

Os antioxidantes não são capazes de proteger completamente o DNA contra o estresse oxidativo e várias lesões como modificações de base, degradação de produtos da desoxirribose e quebras de fitas simples podem ocorrer (Grishko, Rachek *et al.*, 2005). ERO geradas endogenamente pelo metabolismo celular aeróbico são capazes de gerar mais de 50 produtos de oxidação tanto em bases púricas como pirimidínicas, produzindo lesões no DNA por meio do ataque a átomos de C, C12 e C42, na desoxirribose. Algumas dessas lesões são tóxicas, enquanto outras são extremamente mutagênicas, quando não submetidas ao reparo.

Estudos genéticos mostram uma relação direta entre defeitos no reparo de bases danificadas e doenças humanas. Os efeitos de ERO são ainda mais danosos aos tecidos pós-mitóticos, uma vez que as células danificadas não podem ser substituídas. De fato, modificações oxidativas em bases do DNA nuclear e, particularmente, no mitocondrial, são consideradas chave na perda neuronal associada ao envelhecimento e neurodegeneração (Weissman, De Souza-Pinto *et al.*, 2007). Diversas evidências sugerem que danos oxidativos no DNA de células

neuronalis podem contribuir para a etiologia de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose amiotrófica lateral (Vasko, Guo *et al.*, 2005).

A oxidação da guanina ocorre mais facilmente devido ao seu baixo potencial de oxidação, que varia de acordo com a seqüência no DNA (Neeley e Essigmann, 2006). Padrões de mutação distintos foram observados em estudo envolvendo guaninas em três posições, com maior ocorrência de mutações em duas delas sugerindo que o contexto da seqüência interfira na geração de danos e mutagênese induzida por ERO (Agnéz-Lima, Napolitano *et al.*, 2001).

Calcula-se que em uma célula humana, aproximadamente 1.000 resíduos de 8-oxoG/genoma por dia sejam geradas (Kunkel, 1999). A presença de 8-oxoG é particularmente deletéria porque ao adotar a conformação *syn* é capaz de mimetizar a timina (T), emparelhando-se com a adenina (A) (Figura 5) e permitindo que a replicação ocorra mesmo sem o reparo ter sido processado (David, O'shea *et al.*, 2007). A 8-oxoG tem, portanto, potencial mutagênico, uma vez que permite transversões G:C → T:A durante a replicação (Peterson e Cote, 2004).

Numerosos estudos revelaram a ocorrência de mutações G:C→A:T, G:C→T:A e G:C→C:G após a replicação *in vitro* de DNA de células expostas a oxidantes. No entanto, a 8-oxoG não induz mutações G:C→C:G, o que sugere a presença de outras lesões derivadas da guanina responsáveis por esta mutação. De fato, diversos produtos resultantes da oxidação da guanina têm sido relatados (Figuras 5 e 6) (Neeley e Essigmann, 2006).

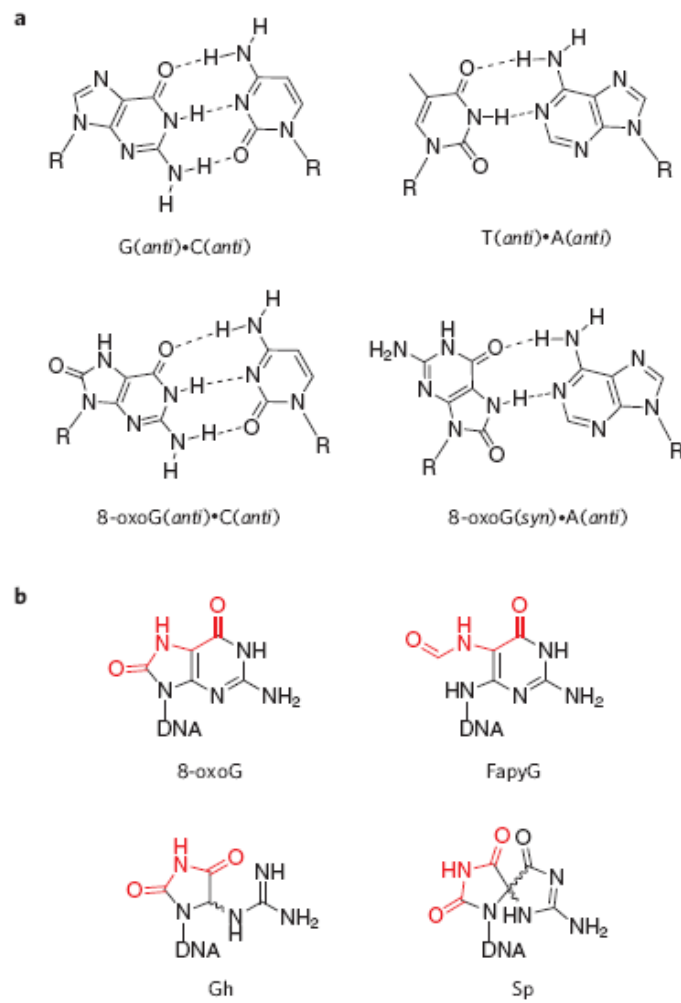
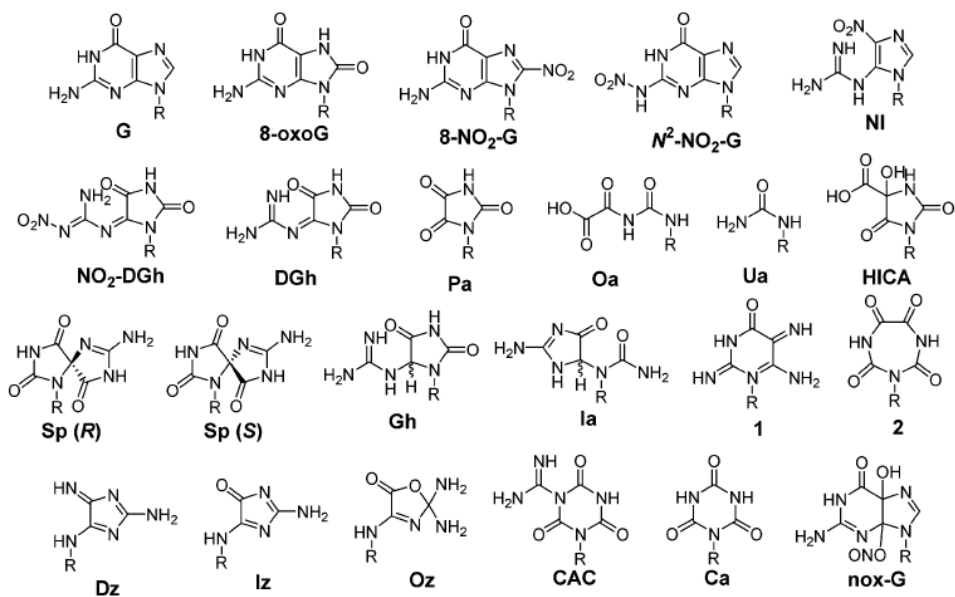


Figura 5 – Estrutura de pares de bases contendo a 8-oxoG (a) e diferentes produtos de sua oxidação (b) (Fonte: David *et al*, 2007).



Abreviação	Nomes comuns
8-oxoG	8-oxoG
8-NO ₂ -G	8-nitroguanina
N ² -NO ₂ -G	N ² -nitroguanina
NI	5-guanidino-4-nitroimidazole; nitroimidazole
NO ₂ -DGh	N-NO ₂ -N'-(2,4-dioxo-imidazolidina-5-ylidene)guanidina
DGh	dehidroguanidinhidantoina
Pa	ácido parabânico
Oa	ácido oxalúrico
Ua	ureia
HICA	4-hidroxi-2,5-dioxo-imidazolidina-4-ácido carboxílico
Sp1 + Sp2	espirominodihidantoina; 2-imino-5,5'-espirodihidantoina
Gh	guanidinhidantoina; 5-guanidinhidantoina
Ia	iminoalantoína
CAC	2,4,6-trioxo[1,3,5]triazin-1-carboxamidine
Ca	ácido cianurico
Diz	diiminoimidazolona
Iz	imidazolona; 2-aminoimidazolona; 2,5-diaminoimidazolona
Z	oxazolona; 2,2,4-triamino-2H-oxazol-5-ona
Nox-G	4,5-dihidro-5-hidroxi-4-(nitrosooxi)guanina
1	6-amino-2,5-diamino-2,5-dihidro-3H-pirimidin-4-ona
2	[1,3,5]triazepan-2,4,6,7-tetraona

Figura 6 – Produtos da oxidação da guanina (Figura adaptada de Neeley e Essigmann, 2006).

Além disso, a 8-oxoG possui um potencial de oxidação ainda menor que o da guanina (Neeley e Essigmann, 2006). Dessa forma, está sujeita a oxidação por $^1\text{O}_2$, podendo gerar diferentes produtos, entre eles, a 2-aminoimidazolona (Iz), oxazolona (Oz), produtos da hidantoína (Hiraku, Ito *et al.*, 2007), como espiroiminodihidantoina (Sp) (Neeley e Essigmann, 2006) e ácido oxalúrico (Duarte, Gasparutto *et al.*, 2001). Nesse contexto, diversas evidências indicam que o $^1\text{O}_2$ reage eficientemente com a 8-oxoG, apresentando taxa de reação duas vezes maior que a reação com a guanina (Neeley e Essigmann, 2006). Os produtos dessa reação estão apresentados na Figura 7.

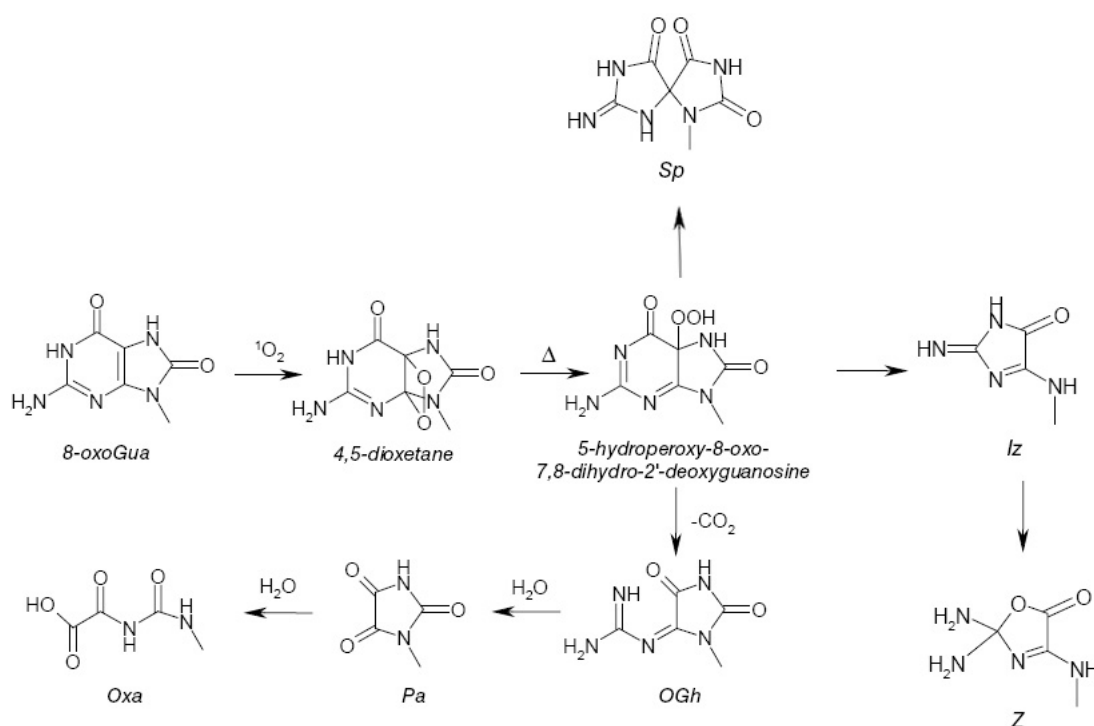


Figura 7 – Produtos gerados pela oxidação da 8-oxoG por oxigênio singlete. [Fonte: (Cadet, Ravanat *et al.*, 2006)]

1.5. REPARO POR EXCISÃO DE BASE

Para proteger a integridade genômica, as células possuem mecanismos capazes de promover o reparo de danos gerados ao DNA, como o reparo por excisão de base (BER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o reparo de bases mal-emparelhadas (mismatch repair). A principal via de reparo de lesões

provocadas por agentes oxidantes ao DNA é o BER, capaz de promover a excisão e a substituição de nucleotídeos danificados no DNA. Dessa forma, o BER protege a célula contra efeitos deletérios de agentes endógenos ou exógenos, como danos causados ao DNA por agentes metilantes e oxidantes ou por sítios abásicos (apurínico/apirimidínico) gerados espontaneamente. Foi estimada, *in vivo*, a geração de 2.000-8.000 sítios abásicos por célula por dia, dependendo do tipo de tecido (Nakamura e Swenberg, 1999).

O BER pode ser subdividido em cinco etapas: (i) remoção de base por uma DNA glicosilase específica; (ii) incisão do sítio abásico resultante por uma AP-endonuclease; (iii) processamento do terminal bloqueado; (iv) preenchimento do sítio abásico e (v) restauração da fita de DNA (Wilson e Bohr, 2007).

O primeiro passo é caracterizado pela ação de uma DNA glicosilase, que após o reconhecimento da base modificada, cliva a ligação N-glicosídica, gerando um sítio apurínico/apirimidínico (sítio AP). Essa lesão, também pode ser gerada espontaneamente ou por radiação e agentes químicos, e é substrato para uma AP-endonuclease ou uma AP-liase, que provoca a quebra de fita simples. Após a clivagem da ligação fosfodiéster, o BER pode seguir por dois caminhos: o curto e o longo, que diferem pelo tamanho da lacuna preenchida e pelas enzimas envolvidas [revisado em (Sung e Demple, 2006)].

A APE1/Ref-1, principal AP-endonuclease de mamíferos, possui um importante papel no BER e participa de ambos os caminhos da via. APE1/Ref-1 promove a incisão na região 5' do esqueleto açúcar-fosfato do sítio AP, por um mecanismo estimulado por Mg^{2+} (Barzilay, Walker *et al.*, 1995), deixando um grupamento 3'-OH e um grupo 5'-fosfato-desoxirribose (dRP) próximo ao espaço do nucleotídeo.

Após essa incisão no DNA, os próximos passos da via curta, adição de um nucleotídeo na lacuna gerada e remoção do grupamento 5'-dRP, são catalisados pela DNA polimerase β (pol β) (Matsumoto e Kim, 1995; Singhal, Prasad *et al.*, 1995; Sobol, Horton *et al.*, 1996). A via curta é caracterizada pela re-síntese de um único nucleotídeo no sítio abásico pela DNA polimerase β (pol β). A atividade liase da pol β é sensível a algumas modificações químicas do grupo dRP. Assim, tais modificações regulam os passos dessa via. Por exemplo, muitos açúcares oxidados ou reduzidos são resistentes à remoção pela dRP liase e o reparo desses

intermediários bloqueados pode seguir pela via longa do BER, a qual envolve a re-síntese de um oligonucleotídeo de 2 a 7 nucleotídeos de comprimento. A síntese de DNA na via longa é realizada pela pol β , pol δ/ϵ , ou outras polimerases, e requer vários fatores de replicação de DNA, incluindo a “flap endonuclease” (FEN1) e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Matsumoto, Kim *et al.*, 1994; Klungland e Lindahl, 1997). O produto final do DNA reparado é selado pela DNA ligase I ou pelo complexo XRCC1/DNA ligase III (Prasad, Singhal *et al.*, 1996; Cappelli, Taylo *et al.*, 1997). A Figura 8 mostra as etapas das duas vias do BER.

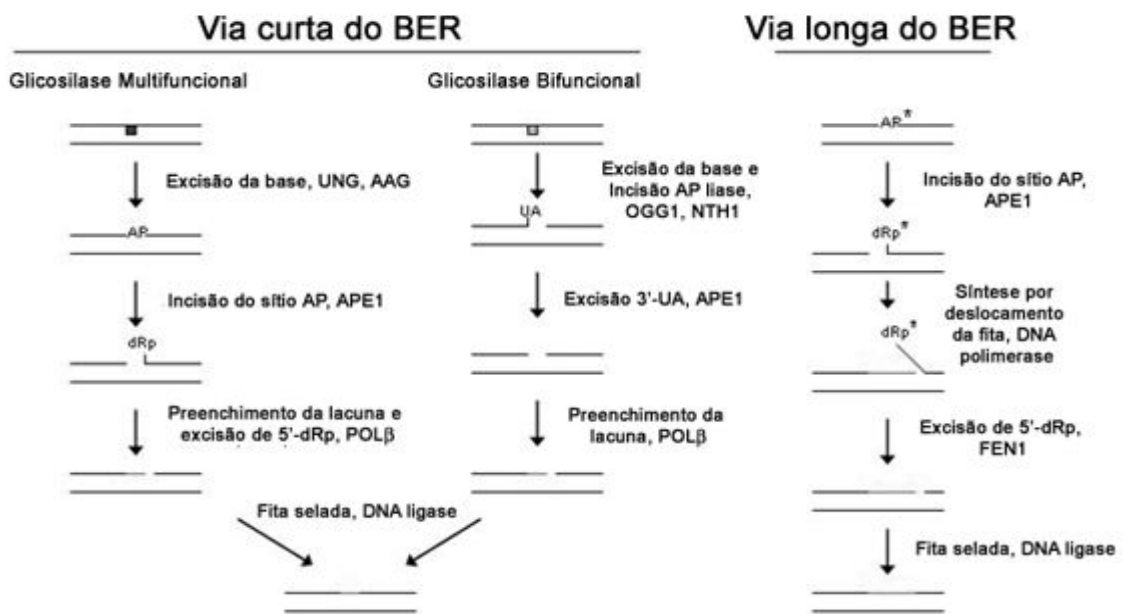


Figura 8. As vias de reparo por excisão de base de mamíferos. A via curta (incorporação de um nucleotídeo único) e a via longa (síntese de reparo que envolve tipicamente 2-7 nucleotídeos) do BER são mostradas. A primeira pode prosseguir a partir da ação de uma DNA glicosilase monofuncional ou bifuncional. Independentemente disso, APE1 e, presumivelmente, POL β , são necessárias para completar o processo. Na via longa, a POL β ou a DNA polimerase PCNA-dependente deslocam a fita contendo o dano, enquanto a FEN1 promove a excisão do DNA intermediário na terminação 5'. Em seguida, a DNA ligase sela o produto da síntese de reparo. Figura adaptada de (Wilson, Sofinowski *et al.*, 2003).

1.6. REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é talvez a via de reparo mais flexível, considerando a diversidade de lesões sob as quais atua. As características comuns entre as lesões reconhecidas pela via NER são aquelas capazes de causar

tanto a distorção da dupla hélice como a modificação química do DNA (Hess, Schwitter *et al.*, 1997). Dentre essas lesões, os dímeros de pirimidina (dímeros de pirimidina ciclobutano e os fotoprodutos-6,4) são as lesões mais significativas causadas por UV. O NER foi caracterizado, em nível bioquímico, em detalhes consideráveis [revisado em (Hutsell e Sancar, 2005)]. Seis fatores de reparo, XPA, RPA, XPC, TFIIH, XPG e XPF-ERCC1, são necessários e suficientes para remover os danos do DNA. Um modelo atual para o NER estabelece XPA, RPA e XPC na primeira etapa de localização dos sítios de danos e de recrutamento do fator de reparo e de transcrição TFIIH, que contém seis polipeptídeos incluindo helicases XPB e XPD que desnaturam o DNA no local do dano e as subunidades XPG e XPF-ERCC1, responsáveis pelas duas incisões nas extremidades 3' e 5', respectivamente. O fator de replicação C (RFC), PCNA e DNA polimerases δ e ϵ preenchem a lacuna, e na etapa final, a DNA ligase I completa o reparo (Figura 9).

O NER distingue-se em duas formas: NER genômico global (GG-NER), que corrige danos em todo o genoma, e o NER acoplado à transcrição (TC-NER), responsável pelo reparo de lesões em fitas transcritas de genes ativos. Essas duas vias são fundamentalmente idênticas, exceto pelos mecanismos de reconhecimento de dano. No GG-NER, o complexo protéico que envolve XPC e HHR23B é responsável pela detecção do dano. Já o reconhecimento do dano pelo TC-NER não requer XPC, mas acredita-se que ocorra quando a maquinaria de transcrição sofre parada no sítio de dano. A parada do complexo da RNA polimerase deve ser revertida de forma a permitir que as proteínas do NER tenham acesso ao dano no DNA. A remoção do complexo ocorre pela ação das proteínas CSA e CSB, assim como outros fatores específicos do TC-NER. Os passos subsequentes do GG- e TC-NER procedem de forma comum às vias [revisado em (Hutsell e Sancar, 2005)].

Reparo do Genoma Global

Reparo acoplado à transcrição

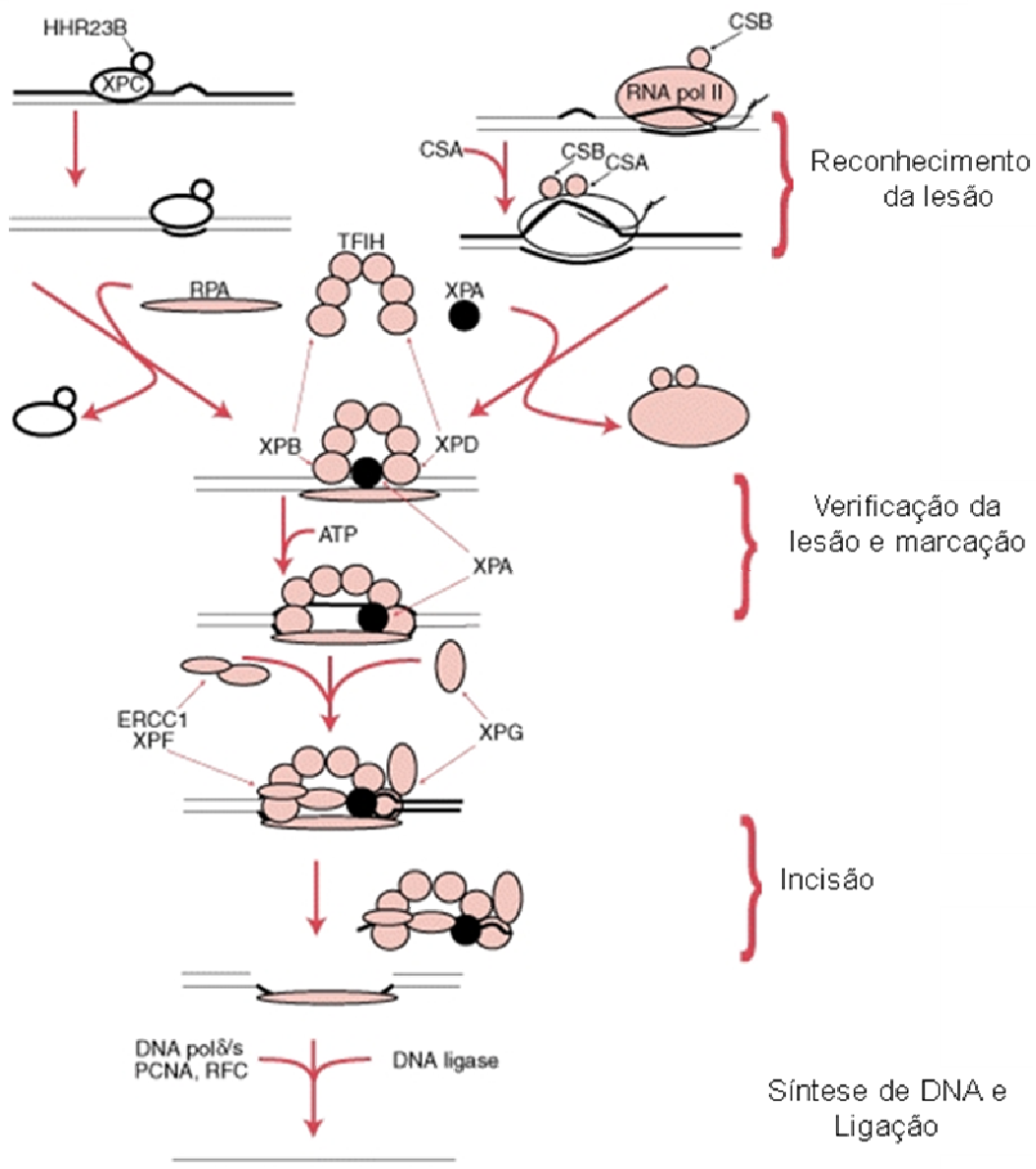


Figura 9 - Modelo para o reparo por excisão de nucleotídeo. XPA participa da via comum entre as duas subvias do NER (GG-NER e TC-NER) na etapa de verificação do dano e recrutamento de outros fatores de reparo. Nucleases específicas são responsáveis pela dupla-incisão nas regiões 5' e 3'. A excisão e polimerização subsequente liberam o oligonucleotídeo que contém a lesão. Figura adaptada de (Cleaver e Mitchell, 2003).

Apesar de o NER ser conhecido geralmente como um sistema de reparo para grandes grupamentos (*bulky adducts*), tem sido visto que ele atua em outras lesões, como bases alteradas por estresse oxidativo que são normalmente processadas pelo BER (Huang, Hsu *et al.*, 1994; Branum, Reardon *et al.*, 2001). Devido a essa propriedade, o NER possui um papel de *backup* para a via BER na remoção desses

danos. O NER é capaz de remover diversas lesões induzidas por ERO, como timina glicol, ciclodeoxiadenosina e 8-oxoG (Reardon, Bessho *et al.*, 1997; Kuraoka, Bender *et al.*, 2000). Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de proteínas do NER na remoção de 8-oxoG (Slupphaug, Kavli *et al.*, 2003; Tuo, Jaruga *et al.*, 2003; D'errico, Parlanti *et al.*, 2006), a principal lesão mutagênica oxidativa, sugerindo o NER como uma via alternativa no reparo desse tipo de lesão durante o estresse oxidativo. No entanto, embora tenha sido demonstrado que o NER é capaz de promover a excisão de 8-oxoG, timina glicol, e talvez outras lesões de base de DNA geradas por estresse oxidativo de forma tão eficiente como os dímeros de timina ciclobutano (Reardon, Bessho *et al.*, 1997), a 8-oxoG e outras lesões oxidativas são reparadas de forma muito eficiente por OGG1 e outras glicosilases (Fromme e Verdine, 2004). Conforme revisado por Van Loon e colaboradores (2010), diversas enzimas têm sido associadas ao reparo de 8-oxoG, como NEIL1, NEIL2, MSH2, além de proteína envolvidas no NER, como CSA, CSB e XPC (Van Loon, Markkanen *et al.*, 2010) (Tabela I). Foi visto que as NEILs, diferente de OGG1 e NTH1, também são funcionais no reconhecimento e remoção de produtos resultantes da oxidação subsequente de 8-oxoG, como Sp e Gu (Hazra, Muller *et al.*, 2001; Hailer, Slade *et al.*, 2005). Também há evidências de que fibroblastos de camundongo embrionário e células-tronco embrionárias deficientes em *msh2* possuem altos níveis basais de 8-oxoG no DNA (Deweese, Shipman *et al.*, 1998; Colussi, Parlanti *et al.*, 2002; Xie, Yang *et al.*, 2004). Associado a isso, camundongos deficientes nessa enzima apresentaram níveis elevados de 8-oxoG em alguns órgãos específicos, o que sugere que a proteção contra danos ao DNA é mediada por diferentes mecanismos de reparo (Russo, De Luca *et al.*, 2007).

Além disso, foi demonstrado que apesar de OGG1 ser essencial no reparo de 8-oxoG em regiões da fita não transcrita, ela não é requerida em regiões da fita transcrita, o que indica a existência de uma via independente de OGG1 no TCR *in vivo* (Le Page, Klunghand *et al.*, 2000). Nesse contexto, já foi reportado que essa lesão localizada na fita transcrita é reparada em um processo dependente da presença de fatores do NER, como o CSB, XPG e TFIIH, além de produtos dos genes BRCA1 e BRCA2 [revisado em (Gallego e Sarasin, 2003)

Tabela 1 – Proteínas envolvidas no reparo de 8-oxoG.

Proteína	Função
OGG1	DNA glicosilase, Ap liase, remove 8-oxoG pareada frente à C e formamidopirimidinas
MUTYH	DNA glicosilase, remove A pareada frente à 8-oxoG
NEIL1	DNA glicosilase, AP liase, remove 8-oxoG pareada frente à C
NEIL2	DNA glicosilase, AP liase, remove 8-oxoG presente em estruturas de bolhas
APE1	AP-endonuclease, 3'-fosfodiesterase
PNK	3'-fosfatase
DNA polimerase β	DNA polimerase, dRP liase
DNA polimerase λ	DNA polimerase, dRP liase
DNA polimerase δ e ϵ	DNA polimerase, 3'→5' exonuclease
PCNA	Proteína auxiliar de DNA polimerases
RF-A	Proteína auxiliar de DNA polimerases
DNA ligase III/XRCC1	DNA ligase
FEN1	Flap endonuclease, 5'→3' exonuclease
DNA ligase I	DNA ligase
hMTH1	8-oxoG-dGTPase
hMSH2	Reconhecimento de mal-emparelhamento
hMLH1	Reparo de bases mal-pareadas
CSB	Reparo de 8-oxoG do genoma
CSA	Reparo de 8-oxoG do genoma
XPC	Reparo de 8-oxoG do genoma

[Tabela adaptada de (Van Loon, 2010)].

No entanto, a contribuição do NER na remoção dos danos oxidativos a bases dos nucleotídeos ainda precisa ser melhor determinada.

1.7. Fator de reparo Xeroderma Pigmentoso – grupo de complementação A (XPA)

Avanços consideráveis sobre o processo do NER humano foi adquirido através do estudo de duas raras desordens autossômicas recessivas - Xeroderma Pigmentoso (XP) e Síndrome de Cockayne (CS). Indivíduos afetados com qualquer

uma destas doenças mostram hipersensibilidade severa à UV devido à deficiência nesse mecanismo de reparo. Ambas as doenças são geneticamente heterogêneas; XP é causada por mutações em um dos sete genes (XPA a XPG), além de um tipo denominado XPV (Xeroderma Pigmentoso Variante), a qual apresenta reparo de DNA normal, mas apresenta deficiência na síntese de DNA quando este é submetido a lesões. Já a CS é causada por defeitos em um dos dois genes (CSA ou CSB) e também por mutações nos genes XPB, XPD e XPG. Os produtos de gene XP são conhecidos por executar várias funções durante o reconhecimento de danos e incisão do DNA (Lindahl e Wood, 1999). Os produtos do gene CS, por outro lado, são necessários para o reparo TC-NER, de genes transcricionalmente ativos (Friedberg, 1996).

O XP é uma síndrome rara caracterizada principalmente pela alta susceptibilidade ao câncer de pele e extrema sensibilidade à luz solar. Pacientes XP apresentam taxas de câncer de pele e olhos mil vezes maior que pessoas saudáveis (Kraemer, Lee *et al.*, 1987; Kraemer, Lee *et al.*, 1994). Manifestações neurológicas progressivas, incluindo a deterioração cognitiva, ocorrem em cerca de 20-30% dos pacientes, sendo mais comum em grupos XPA, D e G. Sintomas oculares são vistos em quase 80% dos pacientes XP, começando na infância com fotofobia e conjuntivite. Mais tarde, os tumores malignos também podem envolver os olhos. Em geral, os pacientes XPA sofrem com pouca ou nenhuma atividade de reparo de DNA, caracterizando a maior sensibilidade e severidade da doença nesses pacientes (Anttinen, Koulu *et al.*, 2008).

O gene XPA está localizado no cromossomo 9q31.1 e codifica uma proteína com domínio dedo-de-zinco com 273 aminoácidos (XPA) que participa do reconhecimento de danos e ligação ao DNA nessas regiões (Miura, Miyamoto *et al.*, 1991; Jones e Wood, 1993; Asahina, Kuraoka *et al.*, 1994). XPA está envolvida em ambas as subvias do NER [revisado por (Sidwell, Sandison *et al.*, 2006)]. O gene é formado por 6 éxons distribuídos em 22-25 kb de DNA genômico (Satokata, Iwai *et al.*, 1993; Topping, Myrand *et al.*, 1995), e mutações foram encontradas em todo o gene, com exceção do éxon I. O primeiro éxon é essencial para a localização nuclear, mas não para o reparo do DNA (Miyamoto, Miura *et al.*, 1992). O éxon II codifica um domínio de ligação ao ERCC1, um componente do heterodímero 5' endonuclease composta por ERCC1 e XPF (ERCC4) (Li, Peterson *et al.*, 1995), e a

supressão da região de ligação de ERCC1 *in vitro* gera um impacto negativo de fenótipo dominante (Li, Peterson *et al.*, 1995). O éxon III codifica o dedo de zinco que se liga a RPA (Li, Lu *et al.*, 1995). Já os éxons IV e V compõem o domínio de ligação ao DNA (Kuraoka, Morita *et al.*, 1996; Ikegami, Kuraoka *et al.*, 1998), enquanto o éxon VI interage com o complexo TFIIH (Park, Mu *et al.*, 1995).

Duas classes de pacientes XPA são conhecidas, aqueles com graves distúrbios do sistema nervoso central, como a surdez neurosensorial, redução da condutividade nervosa, dificuldade para andar e, ocasionalmente, microcefalia, e aqueles com somente sensibilidade da pele e câncer. Os casos mais severos tendem a ter os dois alelos com mutações que ocorrem na região de ligação ao DNA da proteína, resultando muitas vezes em truncamento, e uma análise detalhada e representação diagramática foram publicadas, conforme vista na Figura 10 (States, Mcduffie *et al.*, 1998). Alguns outros casos leves têm mutações perto de um sítio de splicing, de modo que o splicing alternativo pode permitir a persistência de um baixo nível de proteína normal (Sidwell, Sandison *et al.*, 2006).

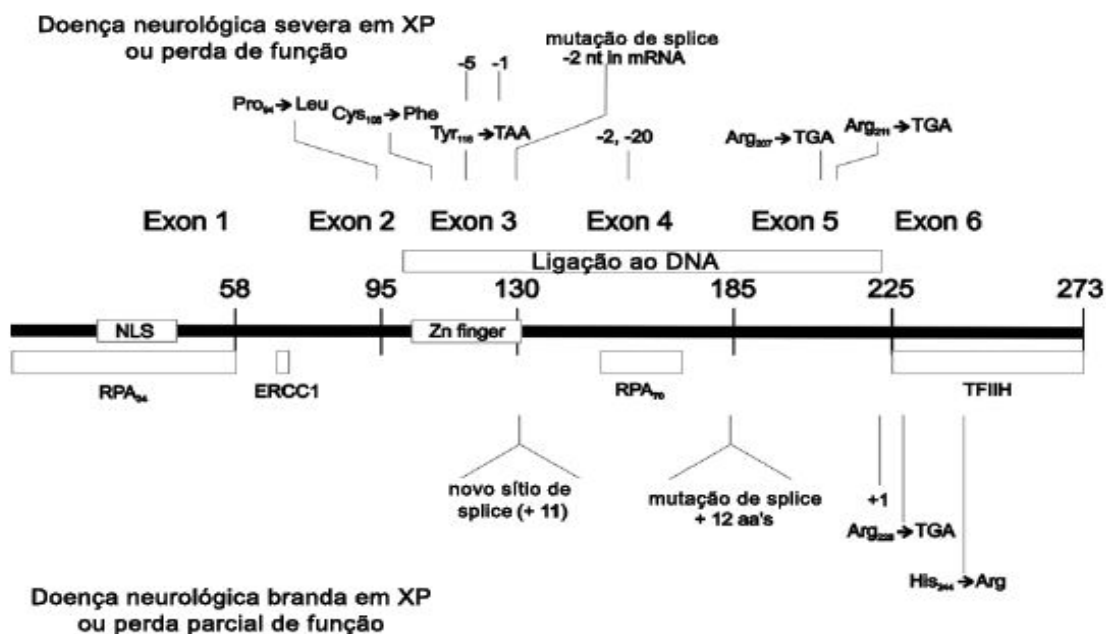


Figura 10 - Localização das mutações no gene XPA. Esta ilustração é típica de um grande número de mutações nesse gene, mas não necessariamente todos os que tenham sido relatados. Figura adaptada a partir de States *et al.*, 1998.

Diversos estudos têm demonstrado que XPA pode estar envolvida no reparo de lesões oxidativas, uma vez que tem sido visto redução no reparo de danos oxidativos no DNA em células deficientes nessa enzima (Satoh, Jones *et al.*, 1993; Jaiswal, Lipinski *et al.*, 1998; De Waard, De Wit *et al.*, 2003; Dusinska, Dzapinkova *et al.*, 2006). No entanto, padrões de expressão dessa proteína na presença de agentes oxidantes e mesmo sob condições de estresse oxidativo induzido por $^1\text{O}_2$ a partir da fotossensibilização do MB ainda não foram descritos, o que revela a importância de estudos que melhor avaliem respostas envolvidas no processo de reparo de lesões oxidativas.

Dessa forma, foi de interesse do presente trabalho investigar respostas celulares de linhagens proficientes e deficientes em XPA, após estresse oxidativo induzido por $^1\text{O}_2$ gerado a partir da fotossensibilização do MB, a fim de esclarecer o envolvimento e a possível regulação da expressão dessa proteína em resposta a esse tipo de estresse, além de corroborar com as evidências que indicam a atuação do NER em lesões oxidativas.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar respostas celulares envolvidas no processo de estresse oxidativo provocado por oxigênio singlete em linhagens humanas deficientes e proficientes em XPA.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar a viabilidade das células tratadas com MB fotossensibilizado (MB+VL) em diferentes concentrações;
- 2) Determinar os níveis de danos oxidativos no DNA pela ocorrência da principal lesão gerada por oxigênio singlete no DNA, a 8-oxoG;
- 3) Quantificar e avaliar a expressão de XPA em seus níveis basais e em diferentes tempos após o tratamento das células com MB;

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Linhagens e cultura celular

Para a realização dos experimentos, buscando uma análise comparativa das respostas celulares em linhagem celular proficiente e deficiente em XPA, foram utilizadas as seguintes linhagens: MRC-5 (células fibroblásticas normais), XP12BE e XP12RO (fibroblastos derivados de biópsias de pele de pacientes XP, grupo de complementação A) e, XP12RO/XPA (células complementadas por AAV2), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, ICB-USP/SP. Todas as linhagens foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) (Invitrogen) e 50 µg de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora Elite II (REVCO) a 37°C e 5% de CO₂.

3.2. Tratamento com MB

Diferentes concentrações de MB fotossensibilizado foram utilizadas para determinação da viabilidade, enquanto concentrações específicas foram utilizadas para a extração de proteínas e quantificação de 8-oxoG. As células foram plaqueadas em subconfluência para os ensaios de viabilidade celular e extração de proteínas e em confluência para o ensaios de quantificação de 8-oxoG. A solução estoque de MB em água ultrapura foi diluída em Minimum Essential Medium α Medium (MEM ALPHA – Invitrogen). As células foram incubadas com essa solução por 1 hora a 37°C e 5%CO₂ para permitir a penetração do corante nas células. Após esse tempo, o meio foi retirado e solução tampão fosfato salina PBSA (NaCl 137mM; KCl 3mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 2mM) foi adicionada às placas, e estas submetidas à fotoativação.

3.3 Fotoativação do azul de metileno

O oxigênio singlete foi gerado a partir da fotoativação do azul de metileno (Merck) em negatoscópio com duas lâmpadas fluorescentes de 15W (Osram) por 20

minutos. As placas de cultura celular foram irradiadas sobre a superfície do negatoscópio.

3.4. Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular 48 horas após o tratamento com as diferentes concentrações de MB foi realizada pelo método de exclusão com o corante *Azul de trypan* 0,4% (Cellgro), indicando o número de células viáveis e não-viáveis, com o auxílio de um hemocitômetro. Este método permite a distinção entre células vivas e mortas, por estas últimas incorporarem o corante e adquirirem coloração azul. A contagem do número de células viáveis e não viáveis foi realizada em microscópio óptico (Tecnal).

3.5. Quantificação de danos oxidativos no DNA (8-oxoG)

8-oxoG é uma das principais lesões mutagênicas induzida por ERO e é comumente utilizada como um biomarcador de estresse oxidativo no DNA. A avidina é utilizada na detecção de 8-oxoG devido a sua alta afinidade por esta lesão, que é estruturalmente similar a biotina (Struthers, Patel *et al.*, 1998). A ligação de avidina conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) aos fibroblastos foi realizada conforme descrito anteriormente, com pequenas modificações (Struthers, Patel *et al.*, 1998). Previamente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com MB+VL, como descrito acima. Em seguida, foram fixadas em metanol absoluto (20 min, -20 °C), permeabilizadas em PBSA contendo 0.1% Triton X-100 (15 min à temperatura ambiente) e bloqueadas contra ligação não-específica com PBSA contendo 10% de SBF (1h à temperatura ambiente). FITC-avidina (Sigma, 1:400 em PBSA) foi adicionado às células, que foram incubadas a 37°C por 1h. Em seguida, as células foram submetidas a quatro lavagens (4x4min) com PBSA/10%SBF, enquanto a detecção de FITC-avidina ligada foi determinada pela fluorescência total emitida por cada poço, quantificada por meio de leitor de fluorescência de placas, com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm.

3.6 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placas de 6 poços para avaliar a presença de 8-oxoG. O método utilizado para detecção dessa lesão foi o mesmo realizado para determinação dos níveis de 8-oxoG gerados logo após o tratamento, conforme descrito no item anterior. Após o ensaio, as lamínulas contendo as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro para FITC.

3.7 Immunoblotting

Os ensaios de immunoblotting foram realizados seguindo protocolos padrões. Após o tratamento com MB+VL, as células foram coletadas, ressuspendidas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 150 mM, SDS 0,1%) e armazenadas a -80°C. A concentração de proteínas foi quantificada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas (10 µg) das proteínas totais foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. Após bloqueio com TBST (2.5 mM Tris, 15 mM NaCl, 0,1% Tween 20)/5% de leite desnatado, as membranas foram incubadas *por 16-18h* com anticorpo monoclonal primário contra XPA (*Abcam*, 1:2000). Após três lavagens com TBST (3 x 10 min), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário complexado a peroxidase (*Southern Biotech*, 1:5000) por 1h 30min. A detecção da expressão foi realizada utilizando o kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

4. RESULTADOS

4.1. Sensibilidade ao MB-VL em células proficientes e deficientes em XPA.

Para confirmar a deficiência da proteína nas linhagens deficientes em XPA, foi realizado um *immunoblotting*. Conforme observado, apenas as linhagens normais e complementadas apresentaram a expressão de XPA (Figura 11A). Apesar da

viabilidade celular das quatro linhagens diminuir após o tratamento de maneira dose-dependente, células XPA não apresentaram uma maior sensibilidade com relação às células normais (Figura 11B) em baixas concentrações. Sob uma concentração de 30 μM MB a viabilidade de MRC5 foi significativamente mais baixa do que a de células XPA ou XPA-complementada. No entanto, em concentrações de 40 e 50 μM MB, a viabilidade da linhagem celular deficiente em XPA, XP12RO, foi em torno de ou menor que 50%, respectivamente, apresentando menor resistência quando comparada a essa linhagem complementada (XP12RO/XPA), nessas mesmas concentrações. Esse resultado indica a atuação da proteína XPA na redução da citotoxicidade causada pelo tratamento. Ainda, a 50 μM MB não houve diferença significativa entre as viabilidades das demais linhagens (MRC5, XP12RO/XPA e XP12BE), sugerindo diferentes respostas aos danos oxidativos entre as linhagens deficientes em XPA. Com base na ausência de uma maior sensibilidade de células XPA comparadas às células normais, foram investigados os níveis de danos no DNA dessas células após o tratamento.

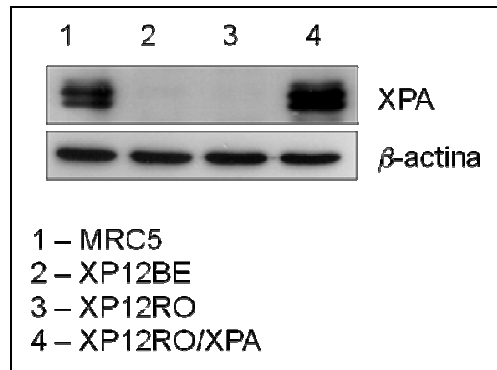
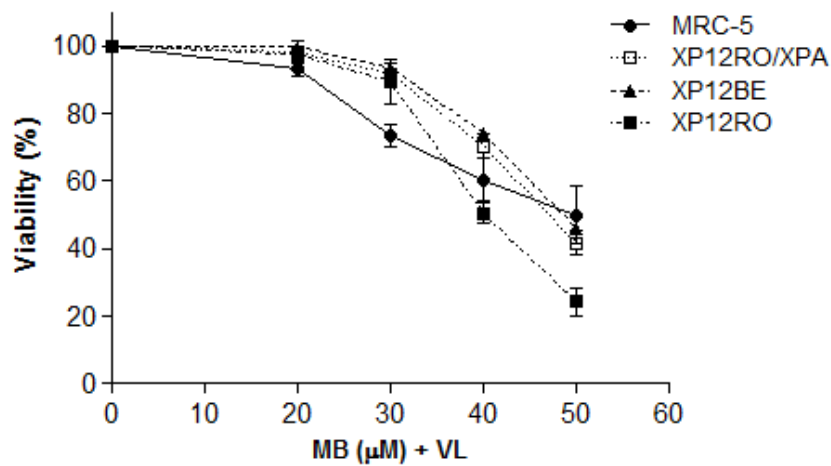
A**B**

Figura 11 – Confirmação da ausência de expressão de XPA em células deficientes e viabilidade de linhagens celulares proficientes e deficientes em XPA após a exposição a doses crescentes de MB+VL. (A) A expressão de XPA foi detectada por *immunoblotting* e (B) a viabilidade foi determinada pelo teste de exclusão com Trypan blue. Nas concentrações de 40 e 50 μ M MB, a complementação de células XP12RO com XPA (XP12RO/XPA) reduziu a citotoxicidade induzida pelo tratamento ($p < 0,001$, teste ANOVA). O gráfico representa as médias de pelo menos três experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

4.2. Células deficientes em XPA mostram mais danos oxidativos no DNA do que células proficientes após exposição à MB+VL

Uma vez que o $^1\text{O}_2$ gera principalmente 8-oxoG, a modificação de base mais freqüentemente induzida por ERO, a geração dessa lesão foi analisada após fotossensibilização por meio da avidina conjugada à FITC. FITC-avidina apresenta a propriedade de se ligar direta e especificamente a 8-oxoG devido à similaridade estrutural à biotina, substrato da avidina (Struthers, Patel *et al.*, 1998). Células XPA não-tratadas foram fracamente coradas por FITC-avidina, enquanto o núcleo das células tratadas com MB-VL exibiu uma forte fluorescência, mostrando que a produção do $^1\text{O}_2$ é capaz de mediar danos oxidativos no DNA (Figura 12a). No entanto, células normais (MRC5) e XPA-complementadas (XP12RO/XPA) não apresentaram um acúmulo significativo de 8-oxoG. Dessa forma, somente as linhagens celulares deficientes em XPA (XP12RO e XP12BE) mostraram níveis elevados dessa lesão (12,5% e 29% maior que o controle não tratado, respectivamente) (Figura 12b).

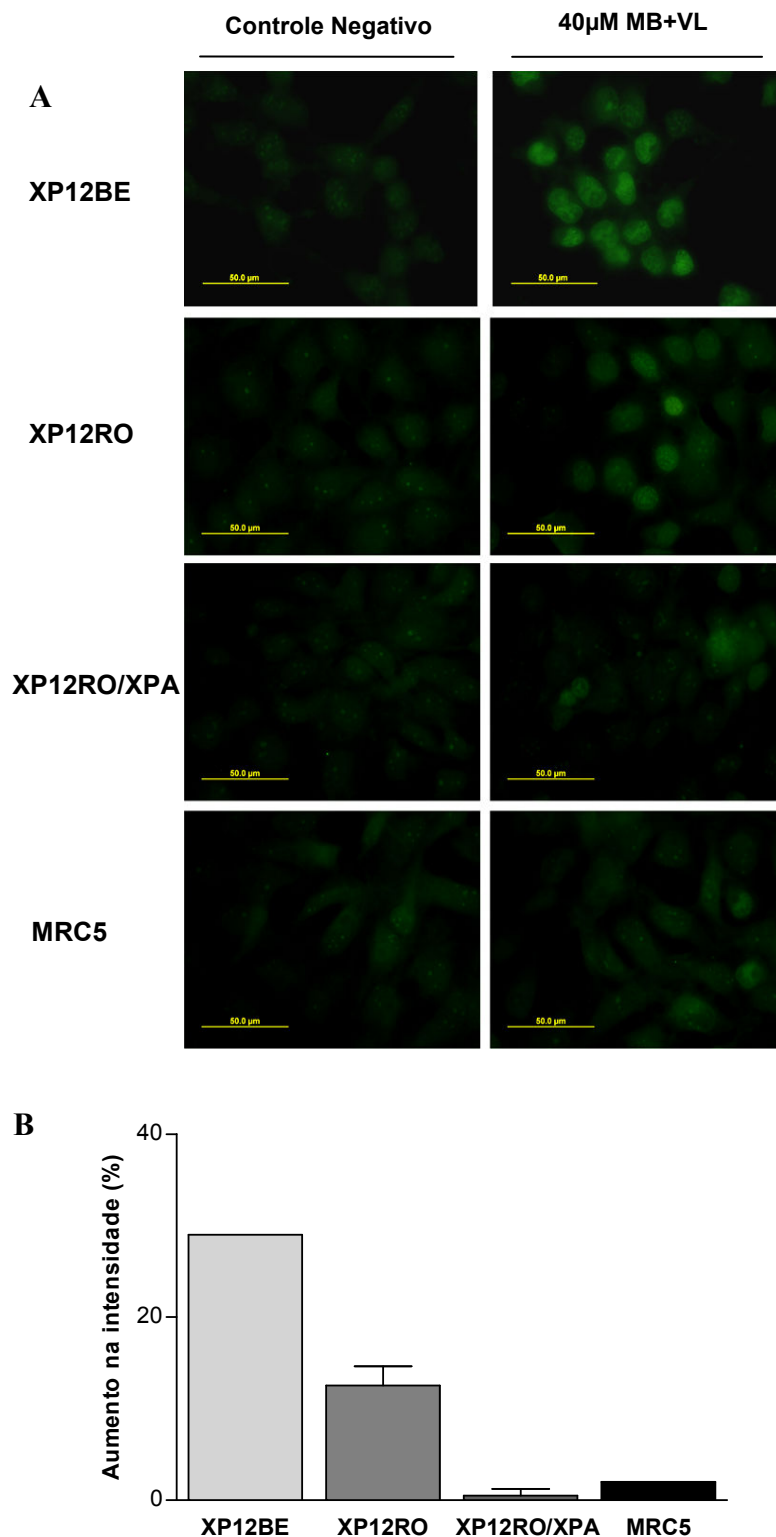


Figura 12 – Formação de 8-oxoG logo após o tratamento com MB(40 μ M)+VL em células proficientes e deficientes em XPA. (A) Os níveis de oxidação induzida por dano ao DNA foram detectados por microscopia de fluorescência, usando 8-oxoG como marcador. Na figura, fotos representativas de dois experimentos independentes, realizadas com as mesmas configurações da câmera (ampliação: X100; escala: 50 μ m). (B) A quantificação de 8-oxoG ligada a FITC-avidina foi determinada pela fluorescência relativa ao controle não tratado.

4.3. MB+VL modula a expressão de XPA em fibroblastos

A fim de avaliar a expressão de XPA sob estresse oxidativo induzido por MB+VL, foi realizado *immunoblotting*, como descrito previamente. De acordo com os resultados, MB+VL foi capaz de modular a expressão de XPA em células normais e complementadas (Figura 13). Em MRC5, 30 e 60 minutos após o tratamento, uma redução significativa na expressão de XPA foi observada (15% e 30%, respectivamente), embora uma redução máxima de 35% nos níveis de expressão de XPA foi detectada quatro horas após o tratamento. No entanto, um aumento significativo nos níveis de expressão de XPA foi observado 24 horas após o tratamento (34%). Para as células XPA-complementadas, houve uma redução de 58% na expressão XPA em 30 minutos após o tratamento, seguida de um aumento crescente em 2, 4 e 24 horas pós-tratamento, chegando a um aumento máximo de 50%.

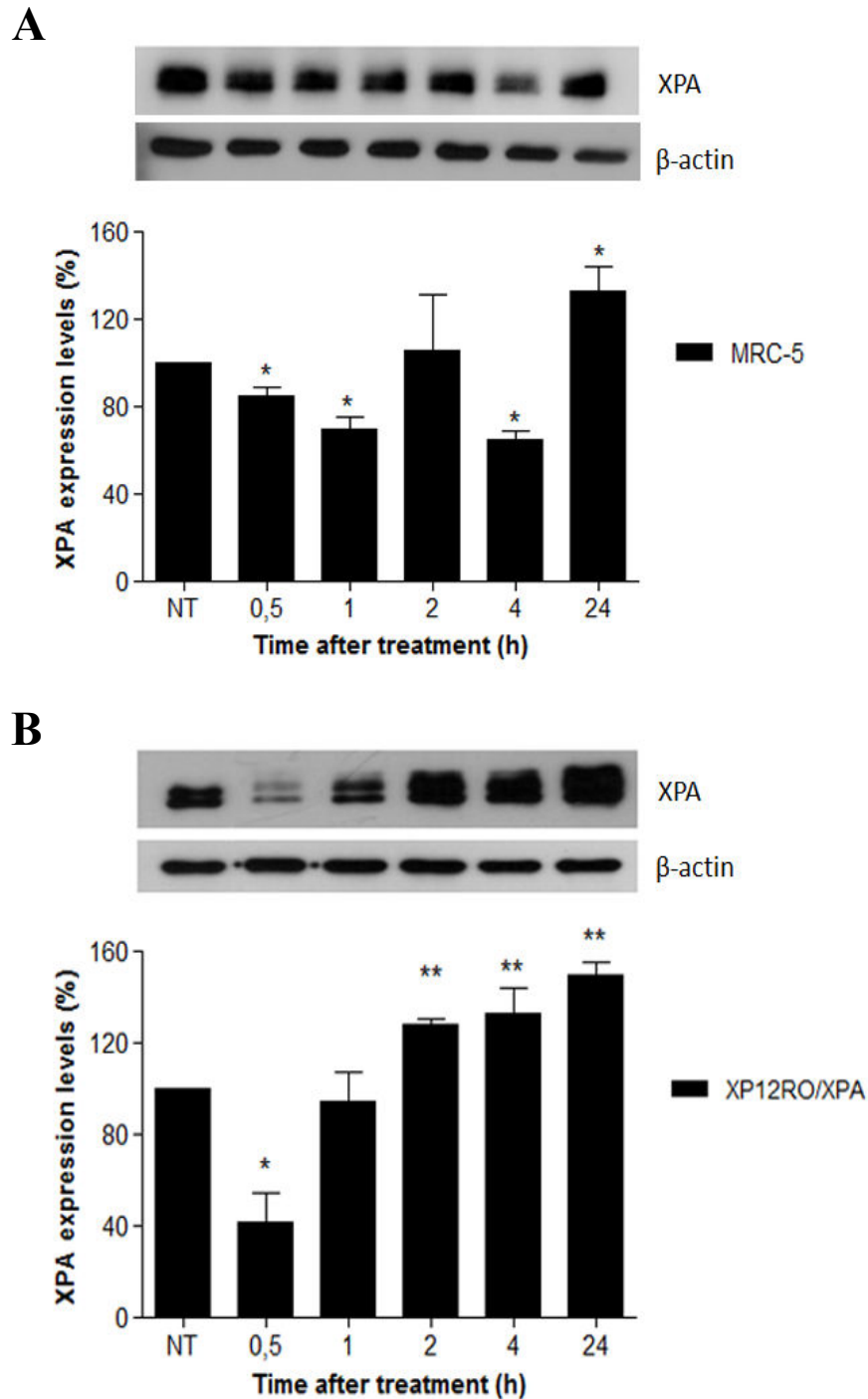


Figura 13 – Análise da expressão de XPA por *immunoblotting* e quantificação das bandas correspondentes em (A) células normais (MRC5) e (B) células XPA-complementadas (XP12RO/XPA) tratadas com MB (20 μ M)+VL. A densitometria foi realizada por meio do software de análise ImageJ (NIH). Os resultados estão expressos como a média da densidade óptica integrada \pm o desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas utilizando o teste t de Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo indicam que os níveis de expressão de XPA podem ser modulados pela terapia fotodinâmica com MB e que as linhagens celulares deficientes em XPA apresentam níveis mais elevados de 8-oxoG após o estresse oxidativo induzido por $^1\text{O}_2$ por meio da fotossensibilização do MB. Estes resultados sugerem que, além da XPA estar relacionada ao reparo de danos oxidativos do DNA, seus níveis de expressão podem ser regulados sob condições de estresse oxidativo gerado pela TFD.

Os dados gerados neste trabalho corroboram com trabalhos anteriores, que mostraram que após o tratamento com agentes oxidantes, células XPA não apresentaram uma grande sensibilidade em relação às células proficientes (Nocentini, 1992; Low, Fok *et al.*, 2008). A viabilidade celular após tratamento com MB-VL foi determinada aplicando teste de exclusão pelo azul de Trypan. De acordo com o resultado, não houve redução significativa na viabilidade, comparada às células proficientes, em concentrações de até 40 μM MB (Figura 11). Esse resultado apresenta-se consistente com estudos anteriores, nos quais, após tratamento com hematoporfirina fotossensibilizada, células XPA apresentaram a mesma faixa de sensibilidade de duas linhagens normais (Nocentini, 1992). Os resultados também corroboram com aqueles obtidos por Low e colaboradores (2008), nos quais as células XPA apresentaram pouca variação na citotoxicidade após tratamento com H_2O_2 comparada às células proficientes, possivelmente porque as células normais possuem a via NER funcional, resultando em detecção de danos e sinalização de morte eficientes (Low, Fok *et al.*, 2008). No entanto, nas maiores concentrações utilizadas, as células XP12RO mostraram-se mais sensíveis ao tratamento que as células normais (MRC5). Adicionalmente, a complementação de *xpa* nessas células foi capaz de aumentar a resistência ao tratamento, comparando-se à das células proficientes. Entretanto, apesar de deficiente em XPA, a linhagem XP12BE não apresentou redução significativa na viabilidade em relação às células normais (MRC5). Em estudo realizado anteriormente foi demonstrada uma forte correlação existente entre a severidade da doença e a perda da função da proteína. Em pacientes afetados com a forma mais severa da doença, a maioria das mutações relevantes no fenótipo patológico resulta de truncamento da proteína, como o caso

das células XP12RO, cuja mutação está no domínio de ligação ao DNA (Tabela II). Outros casos menos severos apresentam mutação próxima ao sítio de splicing, como as células XP12BE, em que o splicing alternativo pode permitir a produção de baixos níveis da proteína normal. Conforme visto por Sidwell e colaboradores (2006), é possível que pequenas quantidades da proteína normal sejam suficientes para aliviar os problemas neurológicos normalmente associados aos defeitos em XPA (Muotri, Marchetto *et al.*, 2002; Sidwell, Sandison *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Mutações em XPA já caracterizadas em amostras de diferentes pacientes.

TABLE 2. XPA Mutations Characterized in Patient Samples*

Cell strain	HGM bank #	Cell severity	Nt change	AA/splice change	RFLP	Location	Inheritance	Comments
XP12BE	GM5509	Mild	G to T G to C	Missplice Missplice	na <i>Afl</i> III	Intron 3 Exon 4	F 9GM5568) M (GM5510)	B wt/wt (GM5566)
XP1CA	GM2990	Severe	C374 del C	Frameshift	<i>MFe</i> I	Exon 3	Homozygote	XP2CA affected 1st C
XP2CA	GM2991	Severe	C374 del C	Frameshift	<i>MFe</i> I	Exon 3	Homozygote	XP1CA affected 1st C
XP5CA	GM2994	Severe	A to G	No splice		Intron 3	Homozygote	
XP23CA	AG6929	Mild	C to T	R228stop	<i>Hph</i> I	Exon 6	Homozygote	
XP13CA	GM3964	Severe	??					
XP3JO	GM2033		G to A	No splice	<i>Pst</i> I	Exon 3	Homozygote	
XP4JO	GM2090		G to A	No splice	<i>Pst</i> I	Exon 3	Homozygote	XP5JO affected 3rd C
XP5JO	GM2091		G to A	No splice	<i>Pst</i> I	Exon 3	Homozygote	XP4JO affected 3rd C
XP3KR	GM5292		G to C C to T	Missplice R228stop	<i>Alu</i> NI <i>Hph</i> I	Intron 3	Unknown	
XP4LO	GM544		2 bp del (A468–A469)	Frameshift		Exon 4	Homozygote	
XP13LO	" "		G to C	Missplice	<i>Afl</i> III	Exon 4	Homozygote	
XP2OS	GM4314		G to C	Missplice	<i>Alu</i> NI	Intron 2	Homozygote	
XP1PD	GM2009		5 nt del (C349–T353) G to T	Frameshift C108F	na	Exon 3 Exon 3	Unknown Unknown	XP2PD affected B
XP2PD	GM2010		5 nt del (C349–T353) G to T	Frameshift C108F	na	Exon 3 Exon 3	Unknown Unknown	XP2PD affected B XP1PD affected B
XP5PD	GM2062		G to C C to T	Missplice R211stop	<i>Afl</i> III <i>Dde</i> I	Exon 4 Exon 5	Unknown	
XP12RO		Severe	C to T	R207stop		Exon 5	Homozygote	
XP25RO	GM710	Severe	C to T	R207stop		Exon 5	Homozygote	
XP22SF	na	Mild	20 bp del (A468–A487) A insertion (663)	Frameshift Frameshift	na na	Exon 4 Exon 5	M (KHSF) F (JHSF)	B wt/20bp del XP26F affected sib
XP26SF	na	Mild	20 bp del (A468–A4487) A insertion (663)	Frameshift Frameshift	na na	Exon 4 Exon 5	M (KHSF) F (JHSF)	B wt/20bp del XP22F affected sib
XP1WI	GM1630		G to C	Missplice	<i>Afl</i> III	Exon 4	Homozygote	F (GM1631); M (GM1632)
" "	GM82		??					M (GM241)
" "	AG6971		5 bp del (C349–T353) A to G	Frameshift New splice		Exon 3 Intron 3	Unknown Unknown	

*na, not applicable; 1st C, 3rd C, first cousin, third cousin; B, brother; F, father; M, mother.

- Destacado em vermelho, as linhagens XP12BE e XP12RO. [Fonte: (States, Mcduffie *et al.*, 1998)]

Já está bem estabelecido que a exposição do DNA à luz visível na presença de certos fotossensibilizadores como MB e riboflavina aumentam consideravelmente a formação de 8-oxoG em DNA purificado ou no DNA de células em cultura (Floyd, West *et al.*, 1990; Schneider, Price *et al.*, 1990; Yamamoto, Nishimura *et al.*, 1992). Sob irradiação, o MB intercalado ao DNA provoca a formação de resíduos de guanina oxidados por intermédio do $^1\text{O}_2$, principalmente a 8-oxoG (Wainwright, Phoenix *et al.*, 1997). A incubação de células THP1 com um gerador de $^1\text{O}_2$ resultou na formação de 8-oxoG no DNA nuclear, indicando que o $^1\text{O}_2$ quando liberado na célula é capaz de oxidar diretamente o DNA celular (Ravanat, Remaud *et al.*, 2000). Por ser a 8-oxoG o principal dano induzido por ERO às bases do DNA, e ser freqüentemente utilizado como um marcador de estresse oxidativo na célula (Schneider, Price *et al.*, 1990; Melvin, Cunniffe *et al.*, 1998), foi realizado o ensaio baseado em FITC-avidina para investigar se os níveis de 8-oxoG mostram-se mais elevados nas células deficientes em XPA. De acordo com os resultados, foi observado um aumento significativo dessa lesão em células XPA após o tratamento com MB+VL (Figura 12). No entanto, esse aumento não foi observado em células normais ou complementadas. Esses resultados indicam claramente que o $^1\text{O}_2$ gerado por MB+VL pode reagir com o DNA e induzir a formação de 8-oxoG em células XPA, sendo essa lesão potencialmente mutagênica. Já está bem estabelecido que o acúmulo de danos oxidativos contribui para a maior freqüência de cânceres e degeneração neurológica em pacientes XP (Satoh, Jones *et al.*, 1993). Conforme relatado em estudo realizado anteriormente, a freqüência de transversões devido a essa lesão é entre 3 e 5 vezes maior em células XPA (Klein, Bleeker *et al.*, 1992). Mais recentemente, foi observada que a taxa de mutações em células tratadas com o agente oxidativo H_2O_2 chega a ser 5 vezes maior em XPA (Wang, Choi *et al.*, 2010).

Por outro lado, a TFD, a qual gera $^1\text{O}_2$ como o principal oxidante durante a fotossensibilização, pode induzir a expressão de uma variedade de genes (Kick, Messer *et al.*, 1995; Gomer, Ryter *et al.*, 1996; Schmidt-Erfurth, Schlotzer-Schrehard *et al.*, 2003; Yow e Cho, 2009). Conforme revisado por Fuchs e Thiele (1998), se as células-alvo não forem destruídas durante a TFD, o estresse foto-oxidativo pode modular a ativação de fatores de transcrição nuclear que regulam a expressão de genes de resposta ao estresse (Fuchs e

Thiele, 1998). O estado redox celular está envolvido na regulação da expressão gênica e as ERO podem atuar como mensageiros químicos e modular a expressão de genes por meio da ativação de vias de transdução de sinal. Como mostrado por Langie e colaboradores (2007), a expressão de genes relacionados ao NER pode ser modulado pelo estresse oxidativo. Estes pesquisadores observaram um aumento nos níveis de mRNA de XPA após tratamento com H₂O₂ (Langie, Knaapen *et al.*, 2007). Neste trabalho, demonstramos a modulação nos níveis de expressão da proteína XPA após o tratamento com MB-VL (Figura 13). De acordo com nossos resultados, os níveis de XPA foram reduzidos após 30 minutos, 1 hora e 4 horas após a fotossensibilização em células normais e após 30 minutos nas células complementadas. No entanto, a expressão mostrou-se aumentada nessas células 2, 4 e 24 horas após o tratamento e em células normais apenas 24 horas após o tratamento, sugerindo que a expressão de XPA pode ser alterada sob condições de estresse oxidativo induzido por ¹O₂. A diferença dos padrões de expressão encontrada entre essas linhagens pode estar relacionada ao fato de que a diferença de expressão de *xpa* mostra ser tecido-específica e dessa forma, a regulação transcricional deve ocorrer de forma célula-específica (Layher e Cleaver, 1997). Além disso, os baixos níveis de expressão dessa proteína observados nos tempos iniciais pós-tratamento pode se dever ao fato de que os níveis de XPA por célula são relativamente baixos (5 a 8 cópias de mRNA por célula), de modo que o turnover dessa proteína possa requerer um tempo muito longo (Muotri, Marchetto *et al.*, 2002). Adicionalmente, sabe-se que proteínas são o maior alvo do ¹O₂ (Glaeser, Zobawa *et al.*, 2007). Ainda, foi reportada uma diminuição da expressão de XPA provocada pela superexpressão da proteína HMGA1 (Reeves e Adair, 2005; Adair, Maloney *et al.*, 2007; Maloney, Adair *et al.*, 2007). Conforme artigos publicados anteriormente, essa proteína pode ser induzida sob condições de estresse (Morikawa, Manabe *et al.*, 2010), inclusive oxidativo (Dhar, Young *et al.*, 2002). Na maioria das células normais, o gene *xpa* é transcrito constitutivamente em níveis muito reduzidos (Cleaver e States, 1997; Layher e Cleaver, 1997). Entretanto, tem sido visto que variações nas concentrações intracelulares de XPA causam efeitos drásticos na eficiência do NER. Cleaver e colaboradores mostraram que mesmo diminuições moderadas nos níveis de XPA reduzem

significativamente as funções do NER (Cleaver, Charles *et al.*, 1995; Muotri, Marchetto *et al.*, 2002). Por outro lado, o vetor utilizado na complementação das células XP12RO/XPA possui o enhancer do citomegalovirus (CMV) associado ao promotor CBA, o que pode levar a uma superexpressão da proteína uma vez que sua transcrição é aumentada por fatores de transcrição induzidos sob condições de estresse oxidativo (Bruening, Giasson *et al.*, 1998). Contudo, esses resultados indicam, claramente, o envolvimento de XPA na resposta ao estresse oxidativo induzido por MB+VL. Em um trabalho publicado recentemente, foi citada a atuação de proteínas do NER (CSA, CSB e XPC) no reparo de 8-oxoG (Van Loon, Markkanen *et al.*, 2010). Uma vez que essa é a principal lesão gerada pela fotoativação do MB, os resultados aqui observados sugerem que a XPA também seja capaz de atuar na correção de 8-oxoG especificamente. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo precisam ser melhor investigados.

Conforme revisado por Hutsell e Sancar (2005), estudos anteriores (Wu, Zhao *et al.*, 2003; Butkiewicz, Popanda *et al.*, 2004) mostraram que o alelo G variante da XPA possui um efeito protetor contra o aparecimento de câncer de pulmão. Esses estudos prevêem que os indivíduos com XPA variante G teriam menor incidência de câncer de bexiga também. Gu e colaboradores (2005) reportaram que essa variante seria responsável pela maior resistência ao tratamento de câncer de bexiga, possivelmente pela maior capacidade de reparo dessa variante, o que provocaria uma maior remoção de danos oxidativos do DNA, prevenindo a via apoptótica e permitindo a maior sobrevivência das células tumorais (Gu, Zhao *et al.*, 2005). No entanto, não foram realizados estudos com amostras da população não-afetada para determinar se o alelo XPA variante G mostra o mesmo efeito protetor contra o câncer de bexiga superficial. Se isso acontecer, este estudo revela uma questão interessante na análise genética de carcinogênese e tratamento do câncer: uma mutação que faz os portadores mais resistentes ao câncer, mas uma vez que o desenvolve, a mesma mutação pode torná-los menos responsivos ao tratamento por agentes que, direta ou indiretamente, causam danos ao DNA (Hutsell e Sancar, 2005). Se o uso da TFD induz a expressão de XPA e essa indução leva a uma maior capacidade de reparo, é possível que haja uma maior resistência à morte celular das células que sobrevivem,

indicando a importância de se conhecer os processos celulares envolvidos nesse tratamento.

6. CONCLUSÃO

Como conclusão, os dados mostrados nesse estudo sugerem que apesar de haver diferenças na viabilidade entre as linhagens deficientes em XPA, a complementação dessa proteína na linhagem XP12RO leva a um aumento na resistência ao tratamento com MB+VL, o que indica o envolvimento dessa proteína em resposta ao estresse oxidativo induzido por $^1\text{O}_2$. Além disso, a ocorrência da principal lesão oxidativa, 8-oxoG, é mais elevada nas células deficientes em XPA, o que sugere o envolvimento dessa proteína no reparo de danos oxidativos no DNA. Adicionalmente, a expressão de XPA pode ser regulada sob condições de estresse oxidativo gerado MB+VL. Esses resultados indicam uma evidência direta da participação de enzimas do NER no reparo de danos oxidativos e torna possível um melhor entendimento sobre os efeitos da TFD na indução da expressão gênica de XPA. Ainda, uma vez que a existência de 8-oxoG pode levar a mutações e ao aumento da susceptibilidade de genotoxicidade induzida por $^1\text{O}_2$ em células XPA, enquanto a viabilidade permanece alta, corroboram com o potencial risco de câncer em pacientes com Xeroderma Pigmentoso A.

7. REFERÊNCIAS:

ADAIR, J. E. et al. High-mobility group A1 proteins inhibit expression of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6044-6052, Jul 1 2007.

AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA repair and sequence context affect (1)O(2)-induced mutagenesis in bacteria. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 13, p. 2899-903, Jul 1 2001.

AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Mechanism of photodynamic therapy-induced cell death. **Methods in Enzymology**, v. 319, p. 342-358, 2000.

ANTTINEN, A. et al. Neurological symptoms and natural course of xeroderma pigmentosum. **Brain**, v. 131, p. 1979-1989, Aug 2008.

ASAHINA, H. et al. The Xpa Protein Is a Zinc Metalloprotein with an Ability to Recognize Various Kinds of DNA-Damage. **Mutation Research-DNA Repair**, v. 315, n. 3, p. 229-237, Nov 1994.

ATAIAN, Y.; KREBS, J. E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. **Biochem Cell Biol**, v. 84, n. 4, p. 490-504, Aug 2006.

BARJA DE QUIROGA, G. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 325-40, 1992.

BARZILAY, G. et al. Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: Identification of residues important for AP endonuclease and RNase H activity. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 9, p. 1544-1550, 1995.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Endogenous Oxidative Damage of mtDNA. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 51-58, 1999.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANUM, M. E.; REARDON, J. T.; SANCAR, A. DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA - A potential source of spontaneous mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25421-25426, Jul 6 2001.

BRUENING, W. et al. Activation of stress-activated MAP protein kinases up-regulates expression of transgenes driven by the cytomegalovirus immediate/early promoter. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 2, p. 486-489, Jan 15 1998.

BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, n. 4, p. 287-295, 2007.

BUTKIEWICZ, D. et al. Association between the risk for lung adenocarcinoma and a (-4) G-to-A polymorphism in the XPA gene. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 12, p. 2242-2246, Dec 2004.

CADET, J. et al. Photosensitized reactions of nucleic acids. **Biochimie**, v. 68, n. 6, p. 813-834, 1986.

_____. Mechanisms and products of photosensitized degradation of nucleic acids and related model compounds. **Israel Journal of Chemistry**, v. 23, p. 420-429, 1983.

_____. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. **Photochem Photobiol**, v. 82, n. 5, p. 1219-25, Sep-Oct 2006.

CAPPELLI, E. et al. Involvement of XRCC1 and DNA Ligase III Gene Products in DNA Base Excision Repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 38, p. 23970-23975, 1997.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CLEAVER, J. E. et al. Overexpression of the Xpa Repair Gene Increases Resistance to Ultraviolet-Radiation in Human-Cells by Selective Repair of DNA-Damage. **Cancer Research**, v. 55, n. 24, p. 6152-6160, Dec 15 1995.

CLEAVER, J. E.; MITCHELL, D. L. Genetic Factors in Skin Carcinogenesis. In: DONALD W KUFEL, R. E. P., RALPH R WEICHELBAUM, ROBERT C BAST, JR, TED S GANSLER, JAMES F HOLLAND AND EMIL FREI (Ed.). **Cancer Medicine**. 6th edition. Hamilton: B.C. Decker, v.1, 2003. cap. 20,

CLEAVER, J. E.; STATES, J. C. The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein. **Biochemical Journal**, v. 328, p. 1-12, Nov 15 1997.

COLUSSI, C. et al. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. **Current Biology**, v. 12, n. 11, p. 912-918, Jun 4 2002.

D'ERRICO, M. et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. **Embo Journal**, v. 25, n. 18, p. 4305-4315, Sep 20 2006.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; HARTMAN, P. E. Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, n. 3, p. 357-362, 1988.

DALTON, T. P.; SHERTZER, H. G.; PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 67-101, 1999.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-50, Jun 21 2007.

DAVIES, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9895-9901, 1987.

DAVIES, K. J.; GOLDBERG, A. L. Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8227-8234, 1987.

DAVIES, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2004.

DE WAARD, H. et al. Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. **DNA Repair**, v. 2, n. 1, p. 13-25, Jan 2 2003.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351-371, 2002.

DEWEESE, T. L. et al. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 20, p. 11915-11920, Sep 29 1998.

DHAR, A.; YOUNG, M. R.; COLBURN, N. H. The role of AP-1, NF-kappa B and ROS/NOS in skin carcinogenesis: The JB6 model is predictive. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234, n. 1, p. 185-193, May-Jun 2002.

DI MASCIO, P. et al. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 355, n. 3, p. 287-289, 1994.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUARTE, J. A. et al. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, v. 14, n. 1, p. 440-3, 1993.

DUARTE, V. et al. Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 46-53, Jan 2001.

DUSINSKA, M. et al. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. **Mutagenesis**, v. 21, n. 3, p. 205-211, May 2006.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 828-834, 2001.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chemico-biological Interactions**, v. 80, n. 3, p. 239-260, 1991.

FENSTER, C. P. et al. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity Research**, v. 10, p. 964-8, 2002.

FLOYD, R. A.; SCHNEIDER, J. E.; DITTMER, D. P. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 61, n. 3, p. 141-151, 2004.

FLOYD, R. A. et al. Mediation of 8-Hydroxy-Guanine Formation in DNA by Thiazin Dyes Plus Light. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 327-330, 1990.

FOOTE, C. S. In: PRYORWA (Ed.). **Free Radicals in Biology**. New York: Academic Press, v.2, 1971. p.85-133.

FOOTE, C. S.; WEXLER, S. Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, p. 3879-3880, 1964.

FORTINI, P. et al. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility **Biochimie**, v. 85, n. 1, p. 1053-1071, 2003.

FRANK, H. A.; COGDELL, R. J. Carotenoids in photosynthesis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 3, p. 257-264, 1996.

FRIEDBERG, E. C. Cockayne syndrome - A primary defect in DNA repair, transcription, both or neither? **Bioessays**, v. 18, n. 9, p. 731-738, Sep 1996.

FROMME, J. C.; VERDINE, G. L. Base excision repair. **DNA Repair and Replication**, v. 69, p. 1-41, 2004.

FUCHS, J.; THIELE, J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 5, p. 835-847, Mar 15 1998.

GALLEGRO, M. P.; SARASIN, A. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1073-1082, Nov 2003.

GLAESER, J. et al. Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in Rhodobacter. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 7, p. 2460-2471, 2007.

GOMER, C. J. et al. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. **Cancer Research**, v. 56, n. 10, p. 2355-2360, May 15 1996.

GRISHKO, V. I. et al. Contribution of Mitochondrial DNA Repair to Cell Resistance from Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 8901-8905, 2005.

GRUNE, T. et al. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1243-1253, 2001.

GU, J. et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms and recurrence after treatment for superficial bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1408-1415, Feb 15 2005.

GUTTER, B. et al. Immunofluorescence for the detection of photochemical lesions in intracellular DNA. **Experimental Cell Research** v. 102, n. 2, p. 413-416, 1976.

HAILER, M. K. et al. Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydroantoin and guanidinohydroantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. **DNA Repair**, v. 4, n. 1, p. 41-50, Jan 2 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, v. 275, p. 257-266, 1992.

HAZRA, T. K. et al. Repair of hydroantoin, one electron oxidation product of 8-oxoguanine, by DNA glycosylases of Escherichia coli. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 1967-1974, May 1 2001.

HESS, M. T. et al. Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6664-6669, Jun 24 1997.

HIRAKU, Y. et al. Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. **Photochem Photobiol**, v. 83, n. 1, p. 205-12, Jan-Feb 2007.

HOFFMANN, S. et al. Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 765-773, 2004.

HUANG, J. C. et al. Substrate Spectrum of Human Excinuclease - Repair of Abasic Sites, Methylated Bases, Mismatches, and Bulky Adducts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12213-12217, Dec 6 1994.

HUTSELL, S. Q.; SANCAR, A. Nucleotide excision repair, oxidative damage, DNA sequence polymorphisms, and cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1355-1357, Feb 15 2005.

IKEGAMI, T. et al. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 8, p. 701-706, Aug 1998.

JAISWAL, M. et al. Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 9, p. 2184-2191, May 1 1998. ISSN 0305-1048.

JONES, C. J.; WOOD, R. D. Preferential Binding of the Xeroderma-Pigmentosum Group-a Complementing Protein to Damaged DNA. **Biochemistry**, v. 32, n. 45, p. 12096-12104, Nov 16 1993.

KANOFSKY, J. R. Singlet oxygen production by lactoperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 10, p. 5991-5993, 1983.

_____. Singlet oxygen production by chloroperoxidase hydrogen peroxide-halide systems. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5596-5600, 1984.

_____. Singlet oxygen production from the peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 28, p. 14171-14175, 1988.

_____. Singlet oxygen production by biological systems. **Chemico-biological Interactions**, v. 70, n. 1-2, p. 1-28, 1989.

KANOFSKY, J. R.; AXELROD, B. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 3, p. 1099-1104, 1986.

KEYNES, R. G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 2, p. 179-91, 2004.

KICK, G. et al. Photodynamic Therapy Induces Expression of Interleukin-6 by Activation of Ap-1 but Not Nf-Kappa-B DNA-Binding. **Cancer Research**, v. 55, n. 11, p. 2373-2379, Jun 1 1995.

KIM, S. Y. Control of Singlet Oxygen-induced Oxidative Damage in Escherichia coli. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 353-357, 2002.

KIM, S. Y. et al. Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 1-2, p. 27-34, 2007.

KIM, S. Y.; TAK, J. K.; PARK, J.-W. Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by singlet oxygen derived from photoactivated rose Bengal. **Biochimie**, v. 86, n. 8, p. 501-507, 2004.

KLEIN, J. C. et al. Repair and Replication of Plasmids with Site-Specific 8-Oxodg and 8-Aafdg Residues in Normal and Repair-Deficient Human-Cells. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 17, p. 4437-4443, Sep 11 1992.

KLUNGLAND, A.; LINDAHL, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). **The EMBO Journal**, v. 16, n. 11, p. 3341-3348, 1997.

KOCHEVAR, E. Singlet Oxygen Signaling: From Intimate to Global. **Science's STKE**, v. 2004, n. 221, p. 1-3, 2004.

KOLACHANA, P. et al. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. **Cancer Research**, v. 53, n. 5, p. 1023-1026, 1993.

KRAEMER, K. H. et al. The Role of Sunlight and DNA-Repair in Melanoma and Nonmelanoma Skin-Cancer - the Xeroderma-Pigmentosum Paradigm. **Archives of Dermatology**, v. 130, n. 8, p. 1018-1021, Aug 1994.

KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; SCOTTO, J. Xeroderma-Pigmentosum - Cutaneous, Ocular, and Neurologic Abnormalities in 830 Published Cases. **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 2, p. 241-250, Feb 1987.

KRINSKY, N. I. Membrane photochemistry and photobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 20, n. 6, p. 532-535, 1974.

KUNKEL, T. A. The high cost of living. American Association for Cancer Research Special Conference: endogenous sources of mutations, 1999. Fort Myers. Trends in Genetics, 11-15 novembro. p.93-94.

KURAOKA, I. et al. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3832-3837, Apr 11 2000.

_____. Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein. **Mutation Research-DNA Repair**, v. 362, n. 1, p. 87-95, Jan 2 1996.

LANGIE, S. A. S. et al. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 3, p. 302-309, Feb 5 2007.

LASKO, P. Gene Regulation at the RNA Layer: RNA binding proteins in intercellular signaling networks. **Science STKE**, v. 2003, n. 179, p. 1-8, 2003.

LAYHER, S. K.; CLEAVER, J. E. Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RT-PCR. **Mutation Research-DNA Repair**, v. 383, n. 1, p. 9-19, Jan 31 1997.

LE PAGE, F. et al. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: The Ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8397-8402, Jul 18 2000.

LI, L. et al. An Interaction between the DNA-Repair Factor Xpa and Replication Protein-a Appears Essential for Nucleotide Excision-Repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 10, p. 5396-5402, Oct 1995.

- _____. Mutations in Xpa That Prevent Association with Ercc1 Are Defective in Nucleotide Excision-Repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 4, p. 1993-1998, Apr 1995.
- LINDAHL, T.; WOOD, R. D. Quality control by DNA repair. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1897-1905, Dec 3 1999.
- LOW, G. K. M. et al. Oxidative damage induced genotoxic effects in human fibroblasts from Xeroderma Pigmentosum group A patients. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 11, p. 2583-2595, 2008.
- MALONEY, S. C. et al. Gene-specific nucleotide excision repair is impaired in human cells expressing elevated levels of high mobility group A1 nonhistone proteins. **DNA Repair**, v. 6, n. 9, p. 1371-1379, Sep 1 2007.
- MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 686-689, 2000.
- MATSUMOTO, Y.; KIM, K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. **Science**, v. 269, n. 5224, p. 699-702, 1995.
- MATSUMOTO, Y.; KIM, K.; BOGENHAGEN, D. F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 9, p. 6187-6197, 1994.
- MCNAIR, F. I. et al. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin. **British Journal of Cancer**, v. 75, n. 12, p. 1721-1729, 1997.
- MELVIN, T. et al. Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 21, p. 4935-4942, Nov 1 1998.
- _____. Guanine is the target for direct ionization of damage in DNA, as detected using excision enzymes. **Nucleic Acids research**, v. 21, p. 4935-4942, 1998.
- MEUCCI, E.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin; conformational and functional changes. Implications in protein aging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 8, p. 4692-4699, 1991.
- MITRA, S. et al. Intracellular trafficking and regulation of mammalian AP-endonuclease 1 (APE1), an essential DNA repair protein. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 4, p. 461-9, Apr 1 2007.
- MIURA, N. et al. Identification and Characterization of Xpac Protein, the Gene-Product of the Human Xpac (Xeroderma-Pigmentosum Group-a Complementing) Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 29, p. 19786-19789, Oct 15 1991.

MIYAMOTO, I. et al. Mutational Analysis of the Structure and Function of the Xeroderma-Pigmentosum Group-a Complementing Protein - Identification of Essential Domains for Nuclear-Localization and DNA Excision Repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 17, p. 12182-12187, Jun 15 1992.

MOREL, Y.; BAROUKI, R. Repression of gene expression by oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 15, n. 342, p. 481-496, 1999.

MORIKAWA, T. et al. The expression of HMGA1a is increased in lymphoblastoid cell lines from schizophrenia patients. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 6-7, p. 736-739, May-Jun 2010.

MULLER, E. et al. Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 5969-5973, 1990.

MUOTRI, A. R. et al. Low amounts of the DNA repair XPA protein are sufficient to recover UV-resistance. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 6, p. 1039-1046, 2002.

NAKAMURA, J.; SWENBERG, J. A. Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues. **Cancer Research**, v. 59, p. 2522-2526, 1999.

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 491-505, 2006.

NIEDRE, M.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 4, p. 382-391, 2002.

NIESS, A. M. et al. Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. **Exercise Immunology Review**, v. 5, p. 22-56, 1999.

NOCENTINI, S. Cellular-Responses to Hematoporphyrin-Induced Photooxidative Damage in Fanconi Anemia, Xeroderma-Pigmentosum and Normal Human Fibroblasts. **Mutation Research**, v. 284, n. 2, p. 275-285, Dec 16 1992.

OH, Y. S. et al. Singlet Oxygen Quenching Activities of Various Fruit and Vegetable Juices and Protective Effects of Apple and Pear Juices against Hematolysis and Protein Oxidation Induced by Methylene Blue Photosensitization. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. C260-C268, 2006.

OHUIGIN, C. et al. Methylene blue photosensitised strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 18, p. 7411-7427, 1987.

OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiation Research**, v. 150, n. 5, p. S146-S156, 1998.

- PAPACONSTANTINO, J. Unifying model of the programmed (intrinsic) and stochastic (extrinsic) theories of aging. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 719, p. 195-211, 1994.
- PARK, C. H. et al. The General Transcription-Repair Factor Tfiif Is Recruited to the Excision-Repair Complex by the Xpa Protein Independent of the Tfiie Transcription Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4896-4902, Mar 3 1995.
- PESKIN, A. V.; KONSTANTINOV, A. A.; ZBARSKY, I. B. An unusual NAD(P)H-dependent O₂⁻ generating redox system in hepatoma 22a nuclei. **Free Radical Research Communications**, v. 3, p. 47-55, 1987.
- PETERSON, C. L.; COTE, J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. **Genes Dev**, v. 18, n. 6, p. 602-16, Mar 15 2004.
- PRASAD, R. et al. Specific interaction of DNA polymerase β and DNA ligase I in multiprotein base excision repair complex from bovine testis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 16000-16007, 1996.
- RAMANA, C. V. et al. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, n. 9, p. 5061-5066, 1998.
- RASHID, F.; HOROBIN, R. W. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 94, n. 3, p. 303-308, 1990.
- RAVANAT, J. L.; CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 8, p. 379-388, 1995.
- RAVANAT, J. L.; REMAUD, G.; CADET, J. Measurement of the main photooxidation products of 2'-deoxyguanosine using chromatographic methods coupled to mass spectrometry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 374, n. 2, p. 118-127, Feb 15 2000.
- RAVANAT, J. L. et al. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 1, p. 17-20, 2004.
- REARDON, J. T. et al. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 17, p. 9463-9468, Aug 19 1997..
- REDMOND, R. W.; KOICHEVAR, E. Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1178-1186, 2006.

REEVES, R.; ADAIR, J. E. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. **DNA Repair**, v. 4, n. 8, p. 926-938, Jul 28 2005.

RÜCK, A. et al. Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 12, n. 4, p. 403-412, 1992.

RUSSO, M. T. et al. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 614, n. 1-2, p. 69-76, Jan 3 2007.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. Singlet molecular oxygen (O-1(2)): A possible effector of eukaryotic gene expression **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1520-1534, 1998.

SANTUS, R. et al. Permeation of lysosomal membranes in the course of photosensitization with methylene blue and hematoporphyrin: study by cellular microspectrofluorometry. **Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n. 1, p. 71-77, 1983.

SATOH, M. S. et al. DNA Excision-Repair Defect of Xeroderma-Pigmentosum Prevents Removal of a Class of Oxygen-Free Radical-Induced Base Lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6335-6339, Jul 1 1993.

SATOKATA, I. et al. Genomic Characterization of the Human DNA Excision Repair-Controlling Gene Xpac. **Gene**, v. 136, n. 1-2, p. 345-348, Dec 22 1993.

SCHMIDT-ERFURTH, U. et al. Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 10, p. 4473-4480, Oct 2003.

SCHNEIDER, J. E. et al. Methylene-Blue Plus Light Mediates 8-Hydroxy 2'-Deoxyguanosine Formation in DNA Preferentially over Strand Breakage. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 3, p. 631-635, Feb 11 1990.

SHARMA, J. et al. Characterization of the Low Molecular Weight Photosystem II Reaction Center Subunits and Their Light-induced Modifications by Mass Spectrometry **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 3935-3943, 1997.

SIDWELL, R. U. et al. A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 1, p. 81-88, Jul 2006.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. In: ENGL, A. C. I. E. (Ed.), v.25, 1986. p.1058-1071.

SIES, H.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced DNA damage. **Mutation Research**, v. 275, n. 3-6, p. 367-375, 1992.

SINGHAL, R. K.; PRASAD, R.; WILSON, S. H. DNA polymerase β conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 2, p. 949-957, 1995.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p. 231-251, Oct 29 2003.

SNYDER, J. W. et al. Subcellular, Time-Resolved Studies of Singlet Oxygen in Single Cells. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, n. 42, p. 14558-14559, 2005.

SOBOL, R. W. et al. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. **Nature**, v. 379, n. 6561, p. 183-186, 1996.

SOBOLEV, A. A.; JANS, D. A.; ROZENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 73, n. 1, p. 51-90, 2000.

STATES, J. C. et al. Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein. **Human Mutation**, v. 12, n. 2, p. 103-113, 1998.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15649-15654, 1993.

STIEF, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 567-572, 2003.

STRUTHERS, L. et al. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. **Anal Biochem**, v. 255, p. 20-31., 1998.

SUNG, J. S.; DEMPLE, B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. **Febs Journal**, v. 273, n. 8, p. 1620-1629, Apr 2006.

TADDEI, F. et al. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 128-130, 1997.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 175-191, 2005.

TEIXEIRA, M. M. et al. Production of singlet oxygen by eosinophils activated in vitro by C5a and leukotriene B4. **FEBS Lett**, v. 453, n. 3, p. 265-8, Jun 25 1999.

TOPPING, R. S. et al. Characterization of the human XPA promoter. **Gene**, v. 166, n. 2, p. 341-342, Dec 12 1995.

TUITE, E. M.; KELLY, J. M. Photochemical reactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 21, n. 2-3, p. 103-124, 1993.

TUO, J. S. et al. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. **Faseb Journal**, v. 17, n. 6, p. 668-674, Apr 2003.

VAN LOON, B.; MARKKANEN, E.; HUBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair**, v. 9, n. 6, p. 604-616, Jun 4 2010.

VASKO, M. R.; GUO, C.; KELLEY, M. R. The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. **DNA Repair (Amst)**, v. 4, n. 3, p. 367-79, Mar 2 2005.

WAINWRIGHT, M. et al. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 40, n. 3, p. 233-239, 1997.

WANG, H. T.; CHOI, B.; TANG, M. S. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photoproducts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12180-12185, Jul 6 2010.

WEISSMAN, L. et al. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1318-1329, 2007.

WILSON, D. M.; BOHR, V. A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. **DNA Repair**, v. 6, n. 4, p. 544-559, 2007.

WILSON, D. M.; SOFINOWSKI, T. M.; MCNEILL, D. R. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. D963-D981, May 2003.

WU, X. F. et al. XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 505-509, Mar 2003.

XIE, Y. L. et al. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-Ras oncogene in lung tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 3096-3102, May 1 2004.

YAMAMOTO, F.; NISHIMURA, S.; KASAI, H. Photosensitized Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Cellular DNA by Riboflavin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 2, p. 809-813, Sep 16 1992.

YOW, C. M. N.; CHO, E. S. M. Modulation of COX2 and hTERT expression by Photodynamic Therapy in human colon cancer cells. **Progress in biomedical optics and imaging**, v. 10, n. 2, 2009.

YU, S. S.; CHANG, S. Y.; MA, C. P. The effect of methylene blue-sensitized photodynamic treatment on bladder cancer cells : a further study on flow cytometric basis. **The Journal of Urology**, v. 149, n. 5, p. 1198-1201, 1993.

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](#)