Barbara Helen Cortat Santos

Papel biológico dos dímeros de pirimidina em células humanas irradiadas com radiação UVA

Biological role of pyrimidine dimers in human cells irradiated with UVA radiation

São Paulo

2010

1. Introdução

1.1. Agentes que danificam o DNA

A molécula de DNA armazena toda a informação genética de um organismo, sendo transmitida aos seus descendentes, portanto, de extrema importância à manutenção de sua integridade. Por outro lado, o DNA é uma molécula altamente reativa. Lesões de diferentes naturezas que alteram sua estrutura podem ocorrer (Figura 1). Alterações que afetam sua estrutura e integridade podem surgir espontaneamente na célula ou serem induzidas por agentes de natureza química ou física, endógenos ou exógenos (FRIEDBERG *et al.*, 2004). Essas lesões interferem em mecanismos celulares essenciais, como replicação e transcrição, e sua persistência pode originar mutações, que apesar de serem a base do processo evolutivo dos seres vivos, podem interferir na funcionalidade das células, levando à morte celular, degeneração de tecidos, envelhecimento, instabilidade genômica e processos carcinogênicos e tumorigênicos (COSTA *et al.*, 2003; WONDRAK *et al.*, 2005).

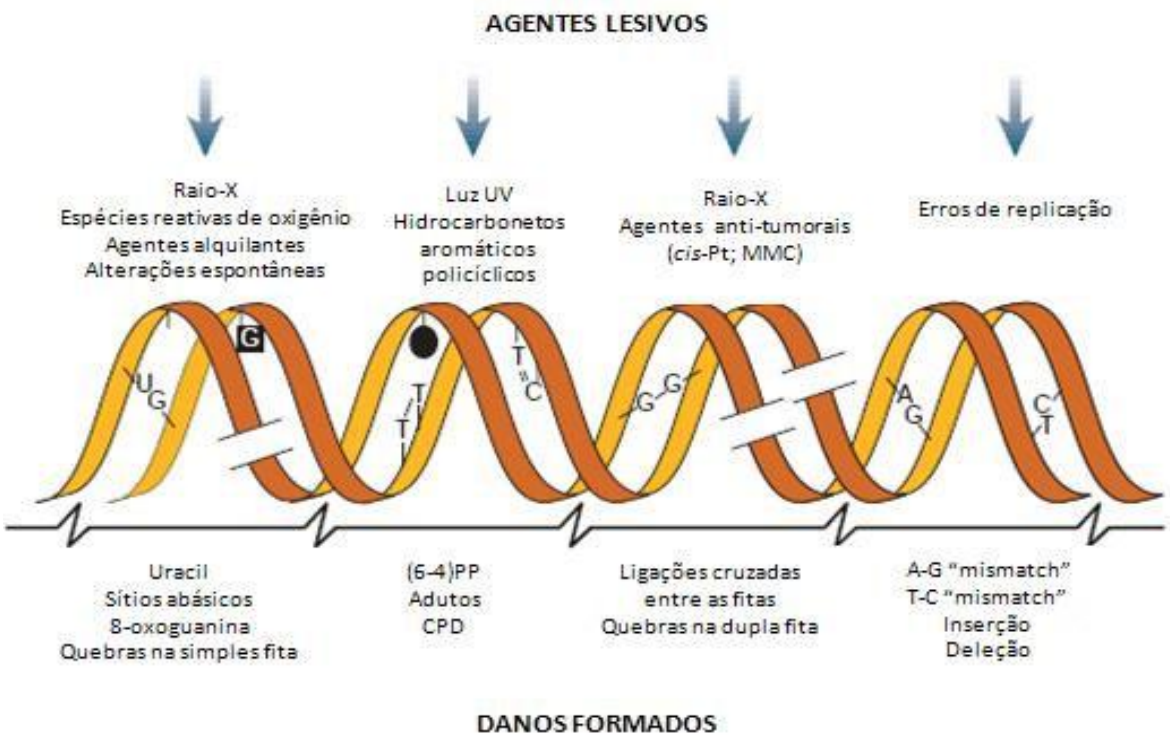

Figura 1 - Esquema ilustrativo de agentes que podem danificar o DNA e exemplos de lesões no DNA induzidas por esses agentes. Abreviações: cis-Pt - cisplatina; MMC - mitomicina-C (Adaptada de HOEIJMAKERS, 2001).

Durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas, comprometendo o seu bom funcionamento, como por exemplo: desemparelhamento de bases; perda do grupo amino; perda das bases do DNA gerando sítios abásicos (APs); durante a replicação pode ocorrer inserção incorreta de nucleotídeo, quebras da fita de DNA entre outros. (HOEIJMAKERS, 2001; FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Lesões também podem ser induzidas pelo próprio metabolismo celular, por exemplo, pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como quando ocorre um vazamento de elétrons da cadeia de transportes de elétrons ou durante processos patológicos. Estas espécies podem reagir com várias moléculas intracelulares, como DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que

a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores como: o local onde a ERO foi gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares são substituíveis, o mesmo não ocorre com o DNA.

Como exemplo de agentes químicos que podem causar danos ao DNA, temos os quimioterápicos que são usados no tratamento de muitos tumores.

A radiação ionizante (IR) é um agente físico de origem ambiental que pode causar danos em todos os componentes celulares e, no DNA, induzir uma enorme variedade de lesões, como quebra da simples fita (SSBs), quebra da dupla fita (DSBs), ligações cruzadas proteína-DNA e várias modificações das bases, algumas induzidas pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RICHARDSON, 2009).

1.1.1. Radiação Solar

Dentre os fatores ambientais, a radiação ultravioleta (UV) tem maior destaque. Além de ser facilmente obtida artificialmente em laboratório, é de grande relevância biológica, uma vez que, desde o começo da evolução da vida no planeta, a maioria dos organismos convive com os efeitos genotóxicos gerados pela radiação solar (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

A radiação solar foi de suma importância para o aparecimento da vida e sua evolução no planeta Terra. Sem a energia proveniente do sol não haveria ativação de um processo vital à vida: a fotossíntese. Um dos produtos finais desta reação é o oxigênio (O_2) que passou a acumular na atmosfera por volta de 2,3 bilhões de anos atrás (KASTING e SIEFERT, 2002). Com o aumento do

O_2 na atmosfera foi possível a formação da camada de ozônio. O ozônio (O_3) é formado pela fotólise de O_2 em O pela radiação UV (< 242 nm) que então reage com O_2, formando O_3 (GRENFELL *et al.*, 2010). Tanto o ozônio como o oxigênio presentes na estratosfera bloqueiam a passagem da radiação UV com comprimentos de onda menores que 280 nm, os mais energéticos e, portanto, mais danosos aos seres vivos, permitindo a evolução da vida em ambientes terrestres (SCHUCH *et al.*, 2009). Na Figura 2 há uma representação ilustrada do espectro solar total, indicando a posição da radiação UV nesse espectro.

.

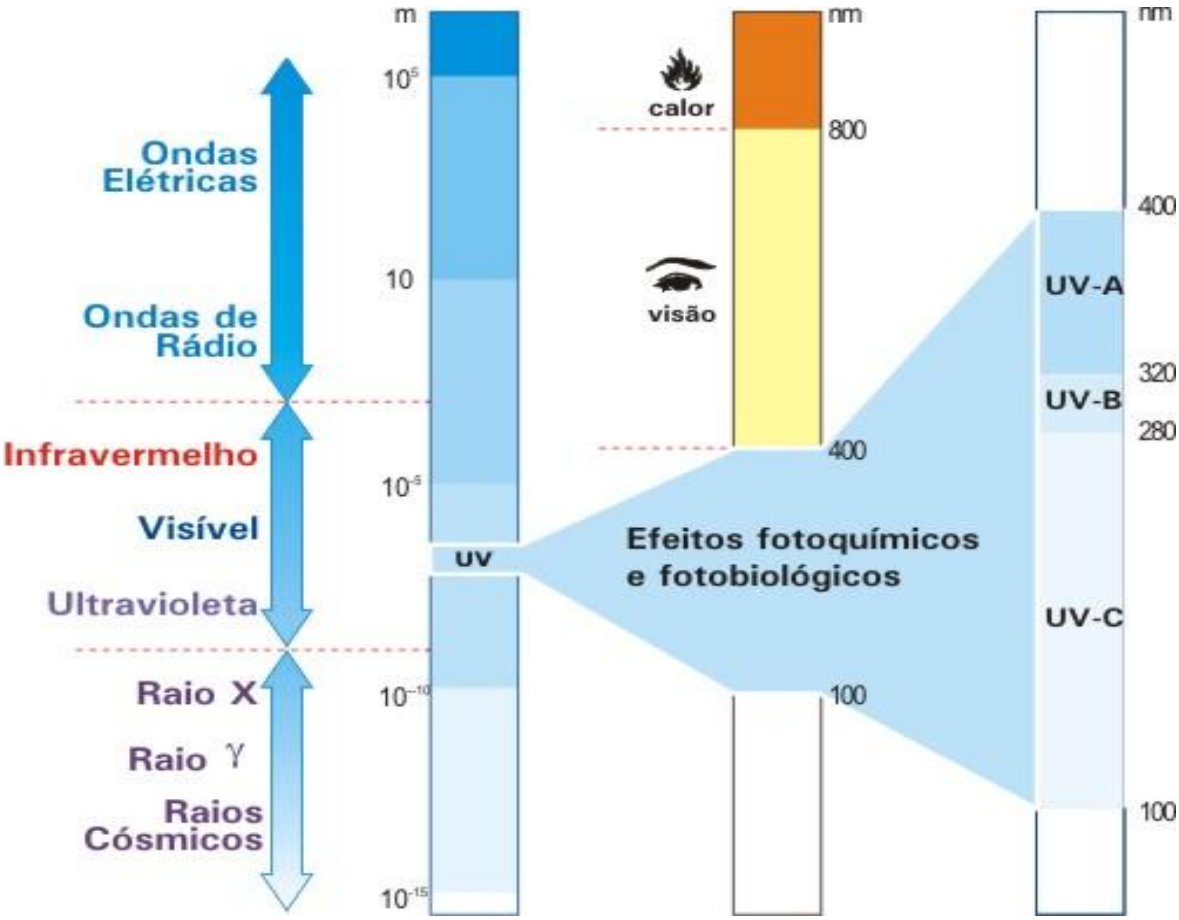

Figura 2 – Representação do espectro solar total. Em destaque estão os espectros da luz visível (centro) e da radiação UV (barra à direita).

(http://www.achetudoeregiao.com.br/astronomia/radiacao_ultravioleta.htm)

A radiação UV é o componente mais prejudicial e mutagênico do espectro solar, representando 8% da radiação solar (RIDLEY *et al.*, 2009), sendo o agente lesivo de natureza física mais comum e biologicamente relevante. A radiação UV, por questões didáticas, é subdividida em três bandas de acordo com seu comprimento de onda: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (200 a 280 nm). A radiação UVC em sua totalidade e parte da UVB são bloqueadas pela camada de ozônio, sendo que somente os espectros correspondentes à UVA e UVB, em seus maiores comprimentos de onda (295 – 320 nm), alcançam a superfície terrestre (DOUKI *et al.*, 2003).

A radiação UVC é a mais energética sendo capaz de causar enormes danos aos tecidos biológicos. Apesar de não atingir a superfície terrestre, é uma das principais ferramentas utilizadas nos laboratórios para investigação dos efeitos de danos no DNA.

A radiação UVB, apesar de representar apenas 5% da radiação UV que atinge a superfície terrestre, tem habilidade de interagir diretamente com a molécula de DNA, tendo efeitos mutagênicos, carcinogênicos e letais aos organismos vivos. Com a redução da camada de ozônio, os níveis da radiação UVB que atingem a superfície da Terra vêm aumentando (WATERWORTH *et al.*, 2002), elevando consideravelmente esses efeitos na biosfera.

Dois tipos de lesões são majoritariamente formados em decorrência da exposição do DNA à radiação UV nos seus menores comprimentos de onda (UVB e UVC): os ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs) (GARINIS *et al.*, 2006). A formação de CPDs ocorre quando bases pirimidínicas adjacentes absorvem a energia da radiação UV, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de

carbono C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso dos 6-4PPs, embora também se trate de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, esta não é cíclica, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3', respectivamente (ASAHINA *et al.*, 1999). Uma representação ilustrativa destas duas lesões é apresentada na Figura 3.

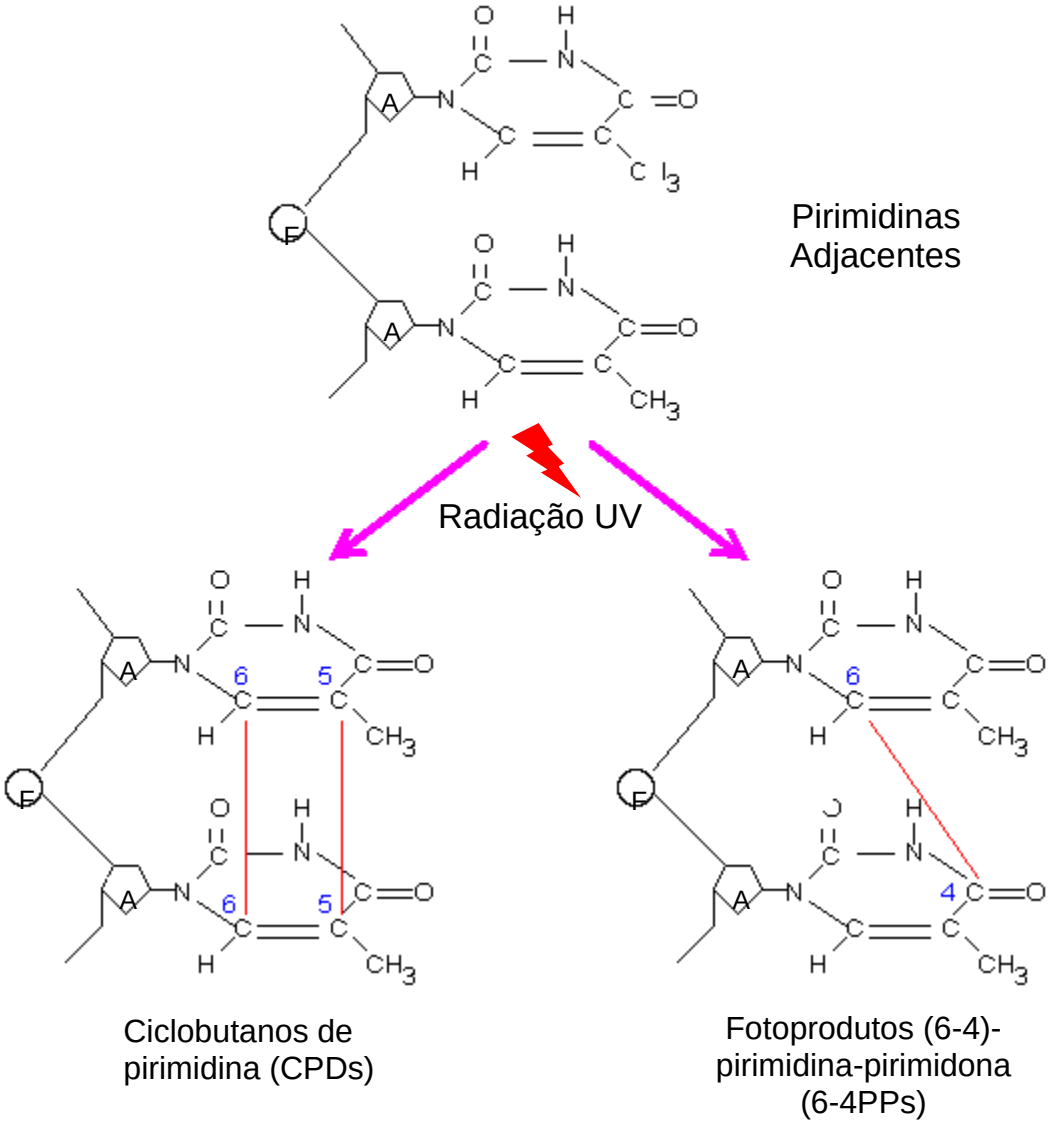

Figura 3 – Principais lesões causadas pela radiação UV no DNA (Modificado: Molecular Biology Web Book- DNA Replication, Mutation and Repair).

Ambos os fotoprodutos são responsáveis por grandes distorções estruturais na dupla hélice de DNA interferindo em mecanismos celulares

constitutivos, como replicação e transcrição, ameaçando a viabilidade e integridade funcional das células e, por consequência, contribuindo para processos mutagênicos e tumorigênicos (MITCHELL *et al.*, 2003).

Segundo Chandrasekhar e Houten (2000) entre 65 a 90% das lesões geradas no DNA pela radiação UVC são CPD e 10 a 35% são (6-4)PP. CPDs são as lesões mais numerosas e, se não reparadas, são muito citotóxicas, pois bloqueiam a síntese transcripcional, inibindo a progressão da RNA polimerase II e ativando a morte celular (CHIGANÇAS *et al.*, 2004). Estas lesões são removidas mais lentamente do genoma (em relação ao (6-4)PP), por isso podem ter importância crucial para a iniciação do câncer de pele, pois os CPDs estão provavelmente envolvidos com a geração de mutações em genes supressores de tumor, como p53, expressos em tumores de pele induzidos por UV (WEBER, 2005).

Representando 95% da radiação UV que atinge a superfície terrestre e antes considerada como relativamente inócua, diversos estudos têm demonstrado a importância da radiação UVA nos processos de envelhecimento e carcinogênese em pele humana. No entanto ainda existem controvérsias em relação à sua genotoxicidade devidas, principalmente, ao fato dela ser pouco absorvida pelo DNA, mas ser capaz de excitar cromóforos, que atuam como fotossensibilizadores endógenos, levando à formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, via ativação de oxidases contendo flavinas ou pela liberação de ferro livre da ferritina (PFEIFER *et al.*, 2005), radical hidroxila (DOUKI *et al.*, 2003) e, principalmente, oxigênio singlete (RÜNGER *et al.*, 1999; CADET *et al.,* 2005). Na figura 4 temos o espectro de absorção da molécula de DNA nos diferentes comprimentos de onda:

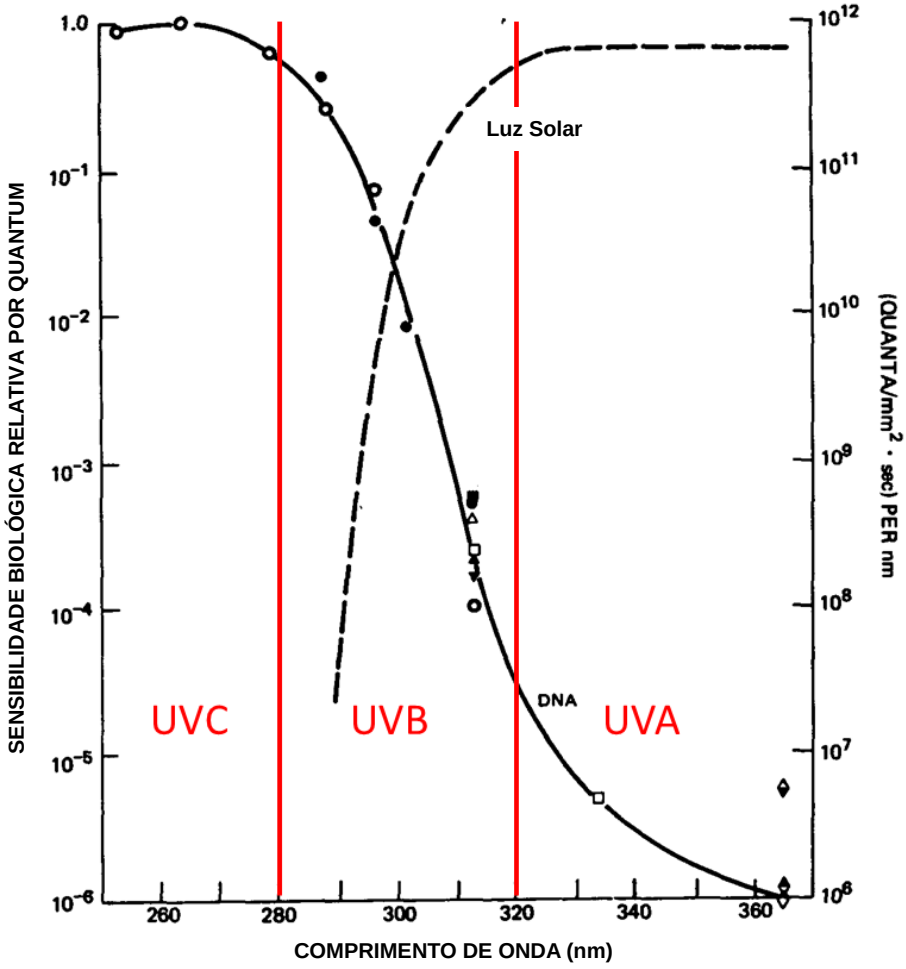

Figura 4 – Espectro de absorção do DNA (linha sólida). A linha pontilhada representa o espectro solar terrestre (Modificado: *Environmental impact of stratospheric flight: Biological and climatic effects of aircraft emissions in the stratosphere*. http://ciesin.org/docs/001-533/001-533.html).

A despeito de a absorção pelo DNA ser mínima nos comprimentos de onda maiores que 320 nm (na ordem de 10^{-5}), ela existe. Acrescente o fato de a radiação UVA ser aproximadamente 20 vezes mais intensa que UVB na superfície terrestre. Neste contexto, recentemente foi demonstrada a formação de lesões CPD pela absorção direta de UVA, provavelmente envolvendo um mecanismo de transferência energética tripla, e também 6-4 PP (SCHUCH *et al.*, 2009). Inclusive muitos grupos vêm demonstrando que as lesões CPD são

majoritariamente geradas após irradiação com UVA ao contrário do que se afirmava anteriormente da relevância de danos gerados por produtos oxidativos (DOUKI *et al.*, 2003; CADET *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 2008). Adicionalmente, a lesão (6-4)PP pode ser convertida ao seu fotoisômero Dewar, quando expostas a comprimentos de onda maiores que 320 nm (Figura 5 – CADET *et al.*, 2005).

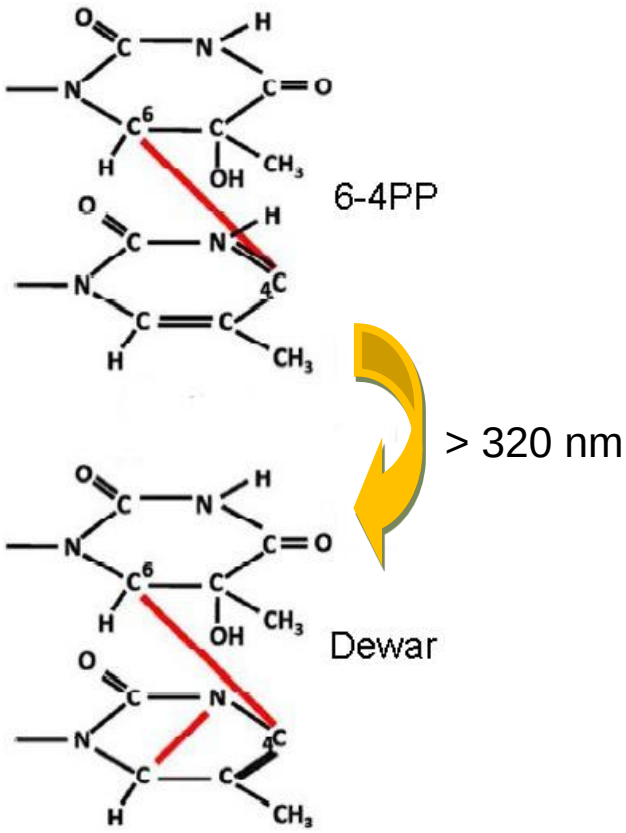

Figura 5 – Fotoisomerização da lesão 6-4PP a Dewar pela exposição a comprimentos de onda maiores que 320 nm.

Também foi demonstrado que a radiação UVA é capaz de gerar quebras simples e duplas na molécula de DNA, que se persistentes, causam aberrações cromossômicas e transformação tumorigênica de queratinócitos (WISCHERMANN *et al.*, 2008).

Além de danos no DNA, a radiação UVA, pela formação de espécies reativas de oxigênio, pode danificar membranas, lipídeos e aminoácidos (MOYSAN *et al.*, 1993; MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2004).

Outra particularidade da radiação UVA é a sua capacidade de penetrar mais profundamente nas camadas da pele. Quanto maior o comprimento de onda, menor será sua interação biológica. A figura 6 mostra um esquema da penetração dos diferentes comprimentos de onda na pele.

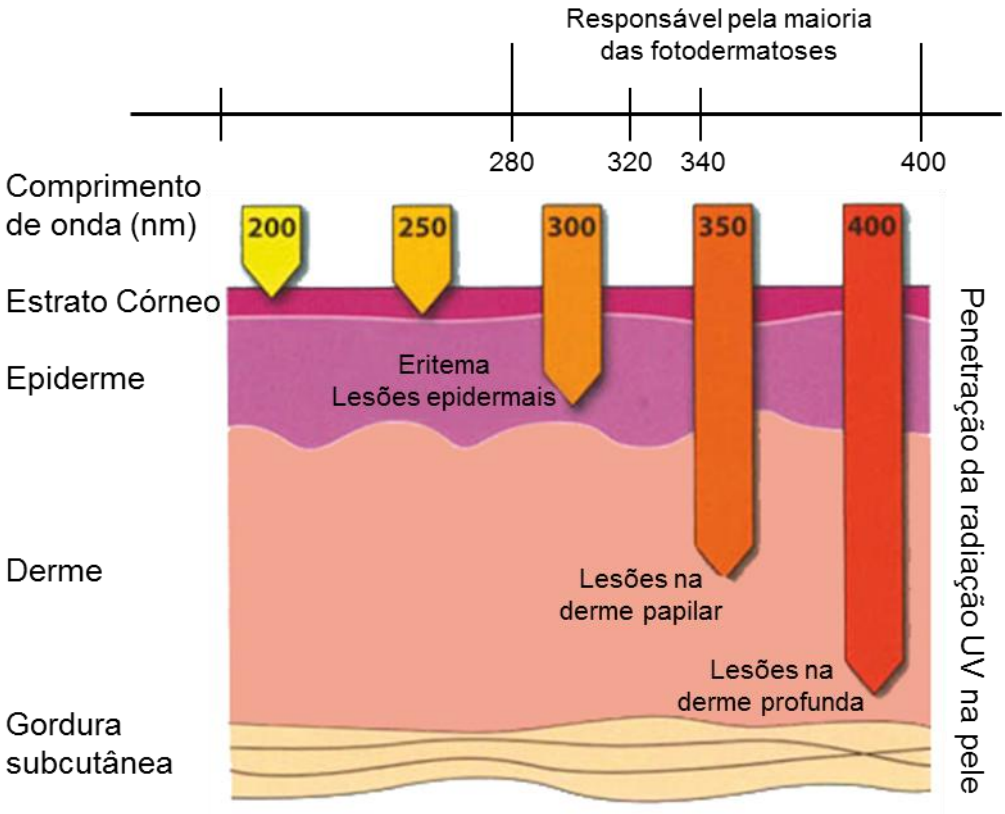

Figura 6 – Penetração da radiação ultravioleta e luz visível na pele humana. Quanto menor o comprimento de onda, maior será a interação biológica. (Modificado de http://www.expatliving.sg/article/body-mind/hair-beauty/save-our-skins).

A radiação UVC, se atingisse a superfície terrestre, causaria danos somente nas camadas mais superficiais da pele. Já a radiação UVB penetra até as camadas suprabasais da epiderme, enquanto a radiação UVA e a luz

visível atingem até a derme. É importante ressaltar que nas camadas mais basais estão localizadas as células progenitoras de pele. Acredita-se que os eventos carcinogênicos iniciais estejam basalmente localizados e em células em divisão (JAVERI *et al.*, 2008). A radiação UVA, portanto, tem sido associada ao desenvolvimento de cânceres de pele (AGAR *et al.*, 2004).

1.2. Mecanismos de Reparo

Para evitar processos de morte celular, instabilidade genômica, mutações entre outros processos, várias estratégias de reparo de DNA foram selecionadas nos organismos durante a evolução auxiliando na manutenção de sua integridade genética. Dentre estes mecanismos de reparo, destacam-se:

1.2.1. Fotorreparo

É uma forma de reparo eficiente e direta que se caracteriza por ter uma única enzima, a fotoliase, a qual remove lesões como CPD ou (6-4)PP, empregando a energia dos fótons emitidos entre 320-500 nm (YASUI *et al.*, 1994). Nesse mecanismo a enzima se liga ao dímero no escuro com alta afinidade e especificidade e, pela absorção de um fóton, restaura a integridade do DNA (MU *et al.*, 2005). Neste processo, não há necessidade de substituição das bases lesadas: a estrutura original da molécula de DNA é recuperada com a reversão da lesão (WEBER, 2005). Na figura 7 temos um esquema deste mecanismo:

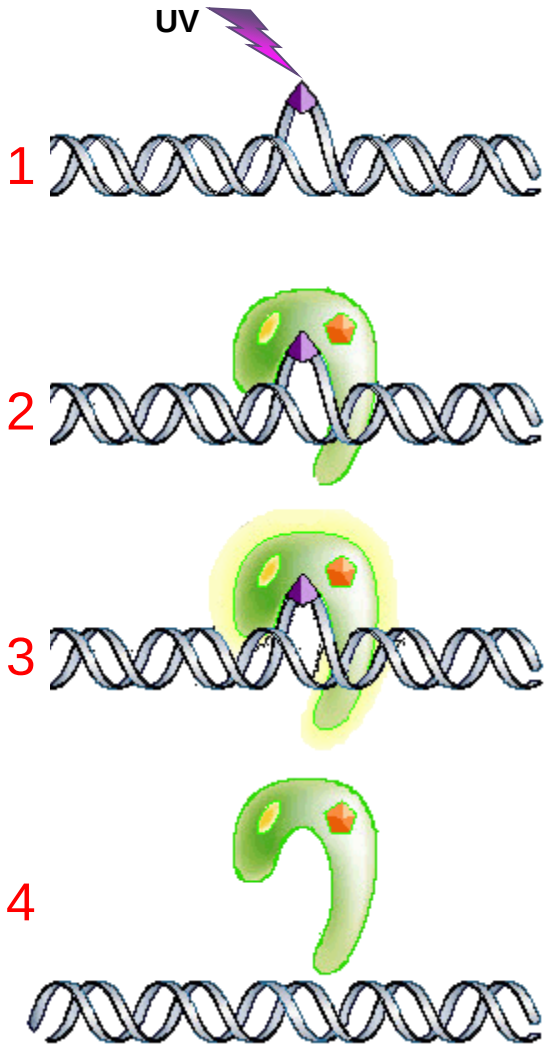

Figura 7 – Esquema do mecanismo de fotorreparo: 1) Formação de um dímero de pirimidina após exposição à radiação UV; 2) Reconhecimento e ligação da fotoliase à lesão, ainda não escuro, com alta afinidade e especificidade; 3) Ativação da fotoliase pela absorção de um fóton > 320 nm; 4) Estrutura do DNA recuperada com a reversão da lesão e liberação da fotoliase (Modificada: FRIEDBERG, 2003).

Dois tipos de fotoliases, que diferem por sua especificidade ao substrato, foram identificados e atividade caracterizada na natureza: a CPD fotoliase é específica para o reparo da lesão CPD, e a (6-4)-fotoliase é específica para o reparo de (6-4)PP (TANAKA *et al.*, 2001). Recentemente, foi relatado que a (6-4)-fotoliase também é capaz de reparar lesões do tipo Dewar, porém menos eficientemente do que (6-4)PP (GLAS *et al.*, 2009).

O fotorreparo é largamente distribuído entre as espécies, abrangendo desde bactérias até plantas e mamíferos. A ampla distribuição da fotoliase e a sua eficiência no uso da radiação emitida pelo sol, a mesma fonte que induz lesões no DNA, indicam que a mesma seria uma proteína antiga que pode ter tido um papel importante na evolução dos seres vivos (YASUI *et al.*, 1994).

As duas fotoliases atuam por mecanismos similares e são homólogas, ou seja, têm origem comum. Os dados filogenéticos indicam que um gene ancestral de fotoliase se duplicou há muito tempo atrás (provavelmente antes do aparecimento dos eucariotos) e estes genes seguiram uma evolução divergente e se especializaram para o reparo dos dois tipos de lesão aqui descritos (YASUI *et al.*, 1994). Entretanto, esta atividade de fotorreparo está ausente em animais placentários (GARINIS *et al.*, 2006). A atividade (6-4)-fotoliase só foi encontrada, até o momento, em poucos organismos como insetos (*Drosophila melanogaster)*, anfíbios (*Xenopus laevis*), plantas (*Arabidopsis thaliana*), fungos (*Neurospora*) e peixes (*Danio rerio* e *Carassius*), sendo que ainda não foi descrita em procariotos (YI *et al.*, 2006) e em leveduras (THOMA, 1999). Aparentemente, os genes que codificam para fotoliases foram perdidos, por razões desconhecidas, durante a evolução de mamíferos placentários, incluindo humanos (Figura 8 - MENCK, 2002).

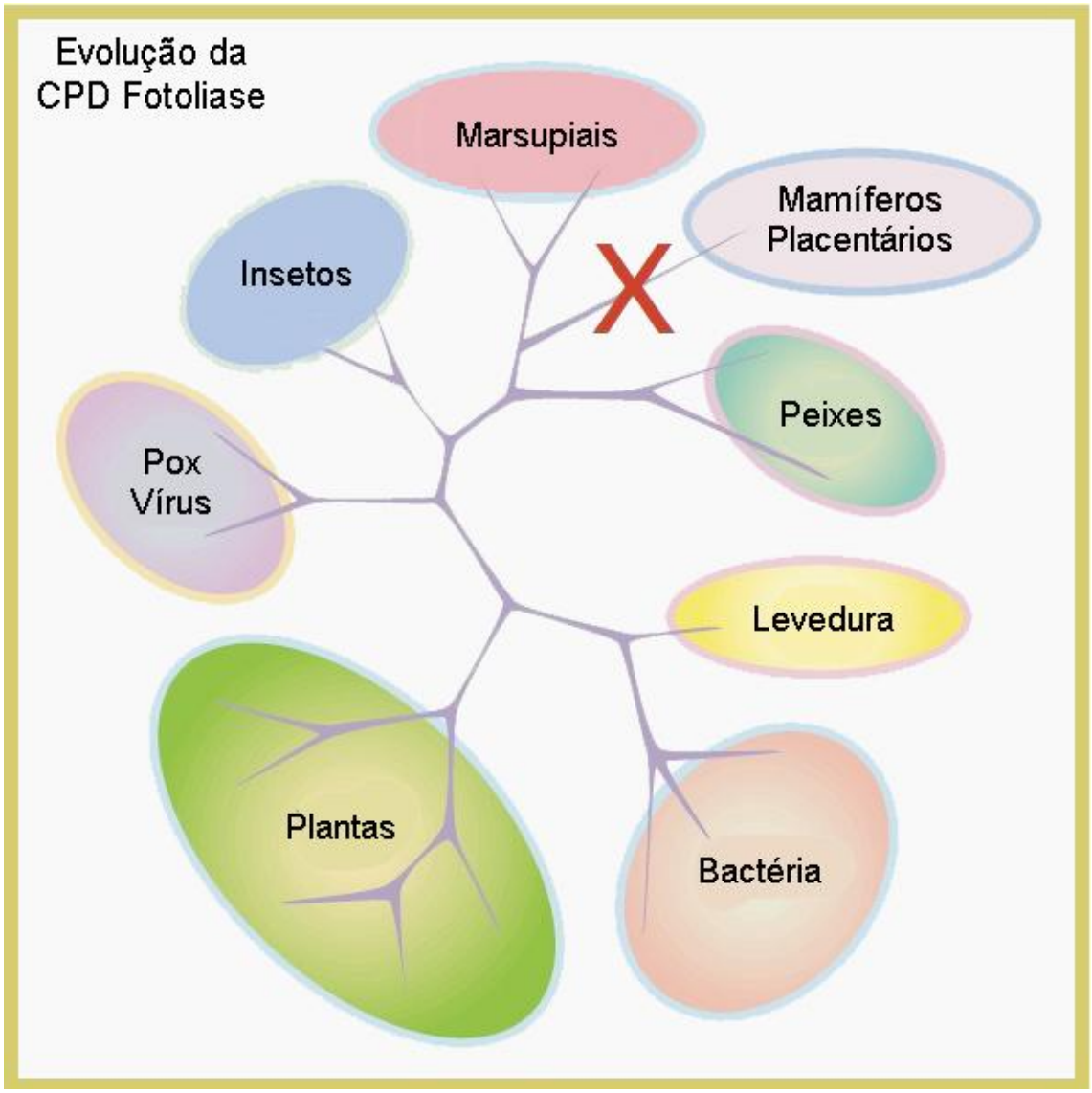

Figura 8 – Evolução do gene que codifica para a CPD fotoliase. O X vermelho indica a perda do gene em mamíferos placentários (Modificado de MENCK, 2002).

Foi reportado que a CPD-fotoliase melhora o reparo por excisão de nucleotídeos em *E.coli* e levedura (TANIDA *et al.*, 2005). É concebível que durante a evolução esta segunda função tenha se tornado mais importante, culminando na completa perda de sua atividade de fotorreativação nos mamíferos placentários. Embora nenhuma função auxiliar seja conhecida para fotoliases em eucariotos superiores, uma grande mudança na sequência pode

ser a consequência do desenvolvimento de funções adicionais (YASUI *et al.*, 1994).

O genoma humano tem dois genes *CRY* que codificam para proteínas com sequências similares às das fotoliases, sendo também homólogas a essas proteínas. No entanto, estes genes codificam para receptores de luz azul que estão envolvidos com o ajuste do ritmo circadiano (WEBER, 2005). Consequentemente, outro mecanismo muito mais complexo e versátil é utilizado por estes organismos para o reparo das lesões CPD e (6-4)PP: o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER – *Nucleotide Excision Repair*).

1.2.2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

NER é um tipo de reparo de DNA altamente conservado caracterizado por sua habilidade de reconhecer e eliminar uma grande variedade de danos estruturais no DNA que causam distorções na dupla hélice, incluindo aquelas causadas pela radiação UV. Ele envolve múltiplos passos intermediários e a ação coordenada de diversas proteínas.

Este mecanismo é dividido em duas subvias: Reparo do Genoma Global (GGR), o qual remove lesões em todo o genoma, no entanto alguns tipos de lesão não são tão bem reconhecidos por esta via; e Reparo Acoplado à Transcrição (TCR), o qual elimina preferencialmente lesões localizadas na fita transcrita de genes ativos. Acredita-se que o TCR serviria como um *backup* para aquelas lesões presentes na fita transcrita que são lentamente ou não reparadas pelo GGR (JANS *et al.*, 2005). O que diferencia essas duas subvias é o passo de reconhecimento da lesão. No TCR sugere-se que a RNApol II é bloqueada frente à lesão e este é o passo principal para o direcionamento das

proteínas de reparo para a fita transcrita. No GGR, o primeiro passo consiste no reconhecimento da lesão através da ligação do complexo XPC-hHR23B ao DNA contendo alguma distorção (COSTA *et al.*, 2003).

O processo do NER em eucariontes envolve a ação de aproximadamente 30 proteínas que atuam em cinco passos sucessivos: 1) reconhecimento da lesão; 2) abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; 3) dupla incisão nas extremidades dessa lesão; 4) síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e 5) ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à sequência original (COSTA *et al.*, 2003).

Após os passos de reconhecimento da lesão, o TCR e o GGR convergem para uma via comum. Primeiro ocorre o recrutamento do fator de transcrição H da RNA polimerase II (TFIIH), incluindo as helicases XPB e XPD que são responsáveis pela abertura da dupla hélice do DNA ao redor da lesão. Paralelamente, são recrutadas as proteínas XPA e RPA para estabilizar as fitas abertas. Após abertas as fitas, as endonucleases XPG e XPF-ERCC1, fazem as incisões no lado 3' e 5' da lesão, respectivamente. O oligonucleotídeo contendo a lesão, com tamanho entre 25-30 nucleotídeos, é removido e o espaço gerado na molécula de DNA é preenchido pela DNA polimerase δ/ε, utilizando como iniciador o grupo hidroxil (OH) deixado na porção 3' pela ação do complexo XPF-ERCC1. Na síntese de reparo, onde ocorre a substituição do oligonucleotídeo removido contendo a lesão, a maioria das proteínas do NER deixa a área da lesão e a maquinaria de síntese de DNA toma seu lugar, restando apenas os fatores de replicação RPA, RFC, PCNA e a DNA polimerase δ/ε. Finalmente, a reação de ligação do oligonucleotídeo recém-

sintetizado é desempenhada pela DNA ligase I (THOMA, 1999; COSTA *et al.*, 2003). A figura 9 sumariza este mecanismo:

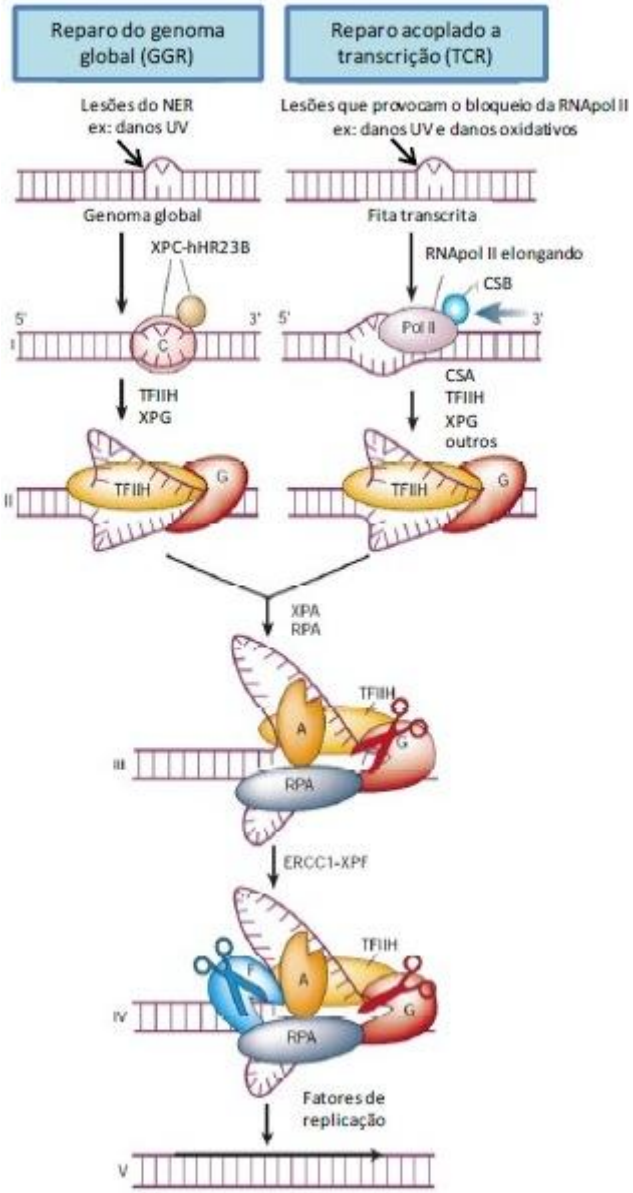

Figura 9 - Modelo geral do mecanismo de NER em humanos. Lesões contidas no genoma global são removidas pelo GGR, enquanto lesões contidas na fita transcrita de um gene ativo são reparadas pelo TCR. Após o reconhecimento da lesão, ocorre abertura da dupla hélice do DNA, a região da lesão é removida e, finalmente, há a síntese de reparo e reação de ligação (Modificada: HOEIJMAKERS, 2001).

Diferentemente do fotorreparo, a remoção das lesões induzidas por UV é feita de maneira lenta, nem sempre eficiente, pelo NER. Os 6-4PPs são mais rapidamente reparados, de modo que pelo menos 80 % dessas lesões são removidas ainda nas primeiras 4 h subsequentes à irradiação. No caso dos CPDs, no entanto, o processo de reparo é mais lento e somente cerca de 60% dessas lesões são reparadas nas primeiras 24 h (RIOU *et al.*, 1999; RIOU *et al.*, 2004). O mesmo foi observado por Chandrasekhar e Houten (2000) em células de *E.coli* proficientes em reparo. Quarenta minutos após a irradiação com radiação UVC, uma média de 42% de (6-4)PPs foi reparada contra apenas 1% de CPDs, sendo que os (6-4)PPs foram reparados 9 vezes mais rapidamente que os CPDs.

As razões para essas taxas diferenciais de reparo são ainda desconhecidas. Questiona-se se isso refletiria nos papéis biológicos dessas duas lesões. Nesse caso, o rápido reparo de 6-4PPs poderia indicar que a permanência dessas lesões seria extremamente deletéria para a célula, levando-a a priorizar o reparo das mesmas ou, por causar distorções mais acentuadas à molécula de DNA, seria mais facilmente encontrada (BESARATINIA *et al.*, 2008) No entanto, essa diferença pode refletir, simplesmente, a acessibilidade dessas lesões às proteínas do NER, já que estas lesões são geradas em regiões diferentes do genoma. Enquanto os CPDs são prioritariamente gerados em nucleossomos, os 6-4PPs encontram-se em DNA *linker*. Nesse caso, sendo mais facilmente detectados e acessados, os 6-4PPs seriam mais rapidamente reparados (RIOU *et al.*, 1999; RIOU *et al.*, 2004). Tem sido observado também que algumas proteínas ligam-

se preferencialmente às lesões (6-4)PP, incluindo algumas proteínas do NER (THOMA, 1999).

Pelo menos 3 síndromes humanas estão associadas a deficiências em uma ou ambas as vias do NER: Xeroderma Pigmentosum (XP), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome de Cockayne (CS). Essas síndromes são raras, com herança autossômica recessiva e os pacientes são caracterizados por apresentar elevada sensibilidade à radiação UV (CHIGANÇAS *et al.*, 2004).

A combinação e intensidade dos sintomas dos pacientes XP variam de acordo com o gene alterado e o grau de evolução da doença. Um dos principais sintomas é a incidência aumentada de tumores (cerca de mil vezes maior que a média da população). Enquanto na população em geral o aparecimento dos primeiros tumores ocorre acima dos 60 anos de idade, em portadores de XP eles surgem, em geral, antes dos 10 anos (CLEAVER, 2000).

Em cerca de 30 % dos pacientes XP ocorre degeneração neurológica progressiva, fato ainda pouco compreendido, mas explicada pelo suposto envolvimento da via de NER com a via de reparo por excisão de base (BER – *Base Excision Repair*), cujo papel está na remoção de danos no DNA induzidos por EROs (MITRA *et al.*, 2001). O consumo de oxigênio pelo tecido nervoso supostamente resultaria em maior produção das EROs e a falta de reparo dessas lesões poderia estar diretamente envolvida na neurodegeneração observada em pacientes XP ou mesmo em CS e TTD.

Existem 8 grupos de complementação: XP clássicos (*XPA a XPG*), nos quais o fenótipo XP é resultado da deficiência na via de NER e XP Variantes (XPV) onde os pacientes são proficientes em NER e a deficiência decorre da incapacidade da maquinaria celular replicar o DNA na presença de fotolesões.

A deficiência nestes pacientes resulta da alteração no gene *POLH* que codifica para a DNA polimerase *eta*, importante na síntese translesão do DNA (CLEAVER, 2000).

Conclusão

As conclusões que podemos tirar deste trabalho são:

- Células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos (XP-A) são sensíveis à radiação UVA, em relação às proficientes em reparo;

- Foi possível detectar, imunologicamente, a formação das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar nas células XP-A e, em menor escala, nas células MRC5. A diferença entre essas duas linhagens se deve, provavelmente, ao reparo das lesões durante o longo processo de irradiação com UVA;

- A transdução de células deficientes em NER com adenovírus recombinantes contendo o gene que codifica para a CPD-fotoliase ou a (6-4)-fotoliase promoveu a redução de lesões detectadas por imuno *slot-blot*, provavelmente devido ao fotorreparo. Mesmo células mantidas no escuro, apresentaram esse fotorreparo indicando a ativação da fotoliase durante a irradiação com UVA. A especificidade das fotoliases confirma a formação de CPD e (6-4)PP pela irradiação de células humanas com radiação UVA;

- Células XP-A transduzidas e irradiadas com doses baixas de UVA, tiveram recuperação da sobrevivência, indicando que, neste caso, os dímeros de pirimidina teriam papel fundamental nos efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pela radiação UVA. Nas células irradiadas com 120 kJ/m^2 de UVA a expressão das fotoliases reduziu a morte celular, porém não tão pronunciada como a observada para as células irradiadas com 100 J/m^2 de UVB. Já nas células irradiadas com 300 kJ/m^2 de UVA não houve diferenças significativas

entre as células expressando as fotoliases e aquelas onde não há fotorreparo. Estes resultados indicam que nas doses médias e altas outros tipos de lesão ao DNA, que não dímeros de pirimidina, como também às outras estruturas e moléculas celulares seriam relevantes para a indução de morte celular.

Resumo

A radiação ultravioleta (UV) pode ser absorvida por diferentes moléculas celulares, incluindo o DNA no qual provoca distorções estruturais. As lesões mais comuns induzidas pela radiação UV são o ciclobutano de pirimidina (CPD) e o fotoproduto (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs]. Estas lesões podem ser reparadas pela fotorreativação, caracterizada por ter uma única proteína (fotoliase) que remove lesões empregando luz visível (320-500 nm) como fonte de energia. Foram identificados dois tipos de fotoliases que diferem por sua especificidade ao substrato: CPD-fotoliase e (6-4)-fotoliase. Um outro mecanismo de reparo é o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), um mecanismo que envolve múltiplos passos e proteínas. Enquanto os efeitos genotóxicos da UVC e UVB já estão relativamente esclarecidos e bem aceitos, ainda existem controvérsias sobre a genotoxicidade da radiação UVA, devido ao fato de ser fracamente absorvida pelo DNA. Alguns autores acreditam que os seus principais efeitos são gerados de forma indireta pela produção de espécies reativas de oxigênio enquanto outros acreditam que a UVA pode gerar danos ao DNA de forma direta, provocando a formação de dímeros de pirimidina. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos genotóxicos da radiação UVA em fibroblastos humanos deficientes e proficientes em NER utilizando adenovírus recombinantes contendo uma ou outra fotoliase para verificar se as lesões CPD e (6-4)PP são geradas pela UVA e se elas teriam alguma importância nas respostas verificadas após irradiação. Foi verificado que as células deficientes no gene *XPA* são mais sensíveis à radiação UVA quando comparadas às células selvagens. Por meio da detecção imunológica, confirmamos a geração das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar, fotoisômero da lesão (6-4)PP, após irradiação com UVA no genoma de células humanas. Empregando vetores adenovirais para transdução de fotoliase específica para lesões tipo CPD ou (6-4)PP, confirmamos que de fato essas lesões são formadas em células humanas deficientes em reparo de DNA após irradiação com UVA. Além disso, esses vírus permitiram verificar a relevância biológica dessas lesões na indução de morte celular em células XP-A irradiadas. De fato, os dados indicam que para doses baixas de radiação UVA essas lesões desempenham um importante papel na indução de morte. Não podemos

descartar, porém, que lesões indiretas (provavelmente geradas por estresse oxidativo) também tenham papel na indução de morte pela radiação UVA, o que parece ser mais importante a doses médias e altas dessa radiação.

Abstract

Ultraviolet radiation (UV) is absorbed by different cellular molecules, including DNA in which induces structural distortions. The most common lesions induced by UV radiation are the cyclobutane pyrimidine (CPD) and the photoproduct (6-4)-pyrimidine-pyrimidone [(6-4)PP]. These lesions can be repaired by the photoreactivation, characterized by a single protein (photolyase) that removes lesions using visible light (320-500 nm) as energy source. Two types of photolyases had been identified that differ by their substrate specificity: CPD-photolyase and (6-4)-photolyase. Another repair mechanism is the nucleotide excision repair (NER), a mechanism that involves multiple steps and proteins. While the genotoxic effects of UVB and UVC are already relatively well-understood and accepted, there is still controversy about the genotoxicity of UVA radiation, due to its low absorption by DNA. Some authors believe that the major effects are generated indirectly by the production of reactive oxygen species, while others believe that UVA can cause damage to DNA directly, inducing the formation of pyrimidine dimers. The aim of this study was to assess the genotoxic effects of UVA radiation in human fibroblasts deficient and proficient in NER, using recombinant adenovirus expressing the photolyases to verify if CPDs and (6-4)PPs are generated by UVA and whether they had any importance in the responses observed after irradiation. It was found that cells deficient in the *XPA* gene are more sensitive to UV radiation compared to wild type cells. By immunological detection, we confirm the generation of CPD, (6-4)PP and Dewar, photoisomer of the (6-4)PP lesion, in the genome of human cells after irradiation with UVA. Using adenoviral vectors for the transduction of photolyases specific for CPD or (6-4)PP lesions, we confirm that in fact these lesions are generated in human cells deficient in DNA repair after irradiation with UVA. Moreover, these viruses allowed us to verify the biological relevance of these lesions in the induction of cell death in irradiated XP-A cells. In fact, our data indicates that for low doses of UVA radiation, these lesions play important roles in the induction of death. We cannot rule out, however, that indirect lesions (probably caused by oxidative stress) could also have a role in the induction of death by UVA radiation, which seems to be more important in intermediate and high doses of this radiation.

Referências Bibliográficas

Agar, N. S., G. M. Halliday, R. S. Barnetson, H. N. Ananthaswamy, M. Wheeler and A. M. Jones "The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 4954-4959, 2004.

Andressoo, J. O. and J. H. Hoeijmakers "Transcription-coupled repair and premature ageing." Mutat Res **577**(1-2): 179-194, 2005.

Armelini, M. G., K. M. Lima-Bessa, M. C. Marchetto, A. R. Muotri, V. Chigancas, R. A. Leite, H. Carvalho and C. F. Menck "Exploring DNA damage responses in human cells with recombinant adenoviral vectors." Hum Exp Toxicol **26**(11): 899-906, 2007.

Asahina, H., Z. Han, M. Kawanishi, T. Kato, Jr., H. Ayaki, T. Todo, T. Yagi, H. Takebe, M. Ikenaga and S. H. Kimura "Expression of a mammalian DNA photolyase confers light-dependent repair activity and reduces mutations of UV-irradiated shuttle vectors in xeroderma pigmentosum cells." Mutat Res **435**(3): 255-262, 1999.

Besaratinia, A., S. I. Kim and G. P. Pfeifer "Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells." FASEB J **22**(7): 2379-2392, 2008.

Birnboim, H. C. and J. Doly "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523, 1979.

Cadet, J., T. Douki, J. L. Ravanat and P. Di Mascio "Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation." Photochem Photobiol Sci **8**(7): 903-911, 2009.

Cadet, J., E. Sage and T. Douki "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17, 2005.

Catalgol, B., I. Ziaja, N. Breusing, T. Jung, A. Hohn, B. Alpertunga, P. Schroeder, N. Chondrogianni, E. S. Gonos, I. Petropoulos, B. Friguet, L. O. Klotz, J. Krutmann and T. Grune "The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression." J Biol Chem **284**(44): 30076-30086, 2009.

Chandrasekhar, D. and B. Van Houten "In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in Escherichia coli." Mutat Res **450**(1-2): 19-40, 2000.

Chigancas, V., A. Sarasin and C. F. Menck "CPD-photolyase adenovirus-mediated gene transfer in normal and DNA-repair-deficient human cells." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3579-3592, 2004.

Cleaver, J. E. "Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum." J Dermatol Sci **23**(1): 1-11, 2000.

Costa, R. M., V. Chigancas, S. Galhardo Rda, H. Carvalho and C. F. Menck "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway." Biochimie **85**(11): 1083-1099, 2003.

Courdavault, S., C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet and T. Douki "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations." DNA Repair (Amst) **4**(7): 836-844, 2005.

de Lima-Bessa, K. M., M. G. Armelini, V. Chigancas, J. F. Jacysyn, G. P. Amarante-Mendes, A. Sarasin and C. F. Menck "CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells." DNA Repair (Amst) **7**(2): 303-312, 2008.

Douki, T., A. Reynaud-Angelin, J. Cadet and E. Sage "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation." Biochemistry **42**(30): 9221-9226, 2003.

Friedberg, E. C. "DNA damage and repair." Nature **421**(6921): 436-440, 2003.

Friedberg, E. C. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., ASM Press, 2006.

Friedberg, E. C., L. D. McDaniel and R. A. Schultz "The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 5-10, 2004.

Garinis, G. A., J. Jans and G. T. van der Horst "Photolyases: capturing the light to battle skin cancer." Future Oncol **2**(2): 191-199, 2006.

Girard, P. M., M. Pozzebon, F. Delacote, T. Douki, V. Smirnova and E. Sage "Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells." DNA Repair (Amst) **7**(9): 1500-1516, 2008.

Glas, A. F., E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul and T. Carell "DNA (6-4) photolyases reduce Dewar isomers for isomerization into (6-4) lesions." J Am Chem Soc **132**(10): 3254-3255, 2010.

Glas, A. F., S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke and T. Carell "Crystal structure of the T(6-4)C lesion in complex with a (6-4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6-4) and Dewar photolesions." Chemistry **15**(40): 10387-10396, 2009.

Grenfell, J. L., H. Rauer, F. Selsis, L. Kaltenegger, C. Beichman, W. Danchi, C. Eiroa, M. Fridlund, T. Henning, T. Herbst, H. Lammer, A. Leger, R. Liseau, J. Lunine, F. Paresce, A. Penny, A. Quirrenbach, H. Rottgering, J. Schneider, D. Stam, G. Tinetti and G. J. White "Co-evolution of atmospheres, life, and climate." Astrobiology **10**(1): 77-88, 2010.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge Free radicals in biology and medicine. Oxford New York, Clarendon Press; Oxford University Press, 1999.

Hanahan, D. "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580, 1983.

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-1858, 2002.

Hoeijmakers, J. H. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374, 2001.

Huang, X. X., F. Bernerd and G. M. Halliday "Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin." Am J Pathol **174**(4): 1534-1543, 2009.

Jaiswal, M., L. J. Lipinski, V. A. Bohr and S. J. Mazur "Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways." Nucleic Acids Res **26**(9): 2184-2191, 1998.

Jans, J., W. Schul, Y. G. Sert, Y. Rijksen, H. Rebel, A. P. Eker, S. Nakajima, H. van Steeg, F. R. de Gruijl, A. Yasui, J. H. Hoeijmakers and G. T. van der Horst "Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene." Curr Biol

15(2): 105-115, 2005.

Javeri, A., X. X. Huang, F. Bernerd, R. S. Mason and G. M. Halliday "Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 protein and gene are expressed more abundantly in the superficial than basal layer of human epidermis." DNA Repair (Amst) **7**(9): 1542-1550, 2008.

Jiang, Y., M. Rabbi, M. Kim, C. Ke, W. Lee, R. L. Clark, P. A. Mieczkowski and P. E. Marszalek "UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly." Biophys J **96**(3): 1151-1158, 2009.

Kasting, J. F. and J. L. Siefert "Life and the evolution of Earth's atmosphere." Science **296**(5570): 1066-1068, 2002.

Knudsen, N. O., S. D. Andersen, A. Lutzen, F. C. Nielsen and L. J. Rasmussen "Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities." DNA Repair (Amst) **8**(6): 682-689, 2009.

Lilie, H., E. Schwarz and R. Rudolph "Advances in refolding of proteins produced in E. coli." Curr Opin Biotechnol **9**(5): 497-501, 1998.

Mahmoud, B. H., C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi and H. W. Lim "Effects of visible light on the skin." Photochem Photobiol **84**(2): 450-462, 2008.

Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin." Toxicol Appl Pharmacol **195**(3): 298-308, 2004.

Menck, C. F. "Shining a light on photolyases." Nat Genet **32**(3): 338-339, 2002.

Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers and L. J. Niedernhofer "Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 232-240, 2003.

Mitra, S., I. Boldogh, T. Izumi and T. K. Hazra "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage." Environ Mol Mutagen **38**(2-3): 180-190, 2001.

Mouret, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet and T. Douki "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13765-13770, 2006.

Moysan, A., I. Marquis, F. Gaboriau, R. Santus, L. Dubertret and P. Morliere

"Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts." J Invest Dermatol **100**(5): 692-698, 1993.

Mu, W., D. Zhang, L. Xu, Z. Luo and Y. Wang "Activity assay of His-tagged E. coli DNA photolyase by RP-HPLC and SE-HPLC." J Biochem Biophys Methods **63**(2): 111-124, 2005.

Nadeau, I. and A. Kamen "Production of adenovirus vector for gene therapy." Biotechnol Adv **20**(7-8): 475-489, 2003.

Orlowski, R. Z. "The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis." Cell Death Differ **6**(4): 303-313, 1999.

Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi and E. Sage "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis." J Biol Chem **275**(35): 26732-26742, 2000.

Pfeifer, G. P., Y. H. You and A. Besaratinia "Mutations induced by ultraviolet light." Mutat Res **571**(1-2): 19-31, 2005.

Ravanat, J. L., T. Douki and J. Cadet "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 88-102, 2001.

Richardson, R. B. "Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea." Aging (Albany NY) **1**(11): 887-902, 2009.

Ridley, A. J., J. R. Whiteside, T. J. McMillan and S. L. Allinson "Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis." Int J Radiat Biol **85**(3): 177-195, 2009.

Riou, L., E. Eveno, A. van Hoffen, A. A. van Zeeland, A. Sarasin and L. H. Mullenders "Differential repair of the two major UV-induced photolesions in trichothiodystrophy fibroblasts." Cancer Res **64**(3): 889-894, 2004.

Riou, L., L. Zeng, O. Chevallier-Lagente, A. Stary, O. Nikaido, A. Taieb, G. Weeda, M. Mezzina and A. Sarasin "The relative expression of mutated XPB genes results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes." Hum Mol Genet **8**(6): 1125-1133, 1999.

Robert, C., B. Muel, A. Benoit, L. Dubertret, A. Sarasin and A. Stary "Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet

B radiation in a human cell line." J Invest Dermatol **106**(4): 721-728, 1996.

Runger, T. M. "Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review." Photodermatol Photoimmunol Photomed **15**(6): 212-216, 1999.

Runger, T. M., K. Moller, T. Jung and B. Dekant "DNA damage formation, DNA repair, and survival after exposure of DNA repair-proficient and nucleotide excision repair-deficient human lymphoblasts to UVA1 and UVB." Int J Radiat Biol **76**(6): 789-797, 2000.

Sambrook, J. and D. W. Russell Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sancar, A. "Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary." J Biol Chem **283**(47): 32153-32157, 2008.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467, 1977.

Schuch, A. P., R. da Silva Galhardo, K. M. de Lima-Bessa, N. J. Schuch and C. F. Menck "Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation." Photochem Photobiol Sci **8**(1): 111-120, 2009.

Schul, W., J. Jans, Y. M. Rijksen, K. H. Klemann, A. P. Eker, J. de Wit, O. Nikaido, S. Nakajima, A. Yasui, J. H. Hoeijmakers and G. T. van der Horst "Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice." EMBO J **21**(17): 4719-4729, 2002.

Tanaka, M., S. Nakajima, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido and K. Yamamoto "Effects of photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts on ultraviolet mutagenesis in SOS-induced repair-deficient Escherichia coli." Mutagenesis **16**(1): 1-6, 2001.

Tanida, H., E. Tahara, M. Mochizuki, Y. Yamane and M. Ryoji "Purification, cDNA cloning, and expression profiles of the cyclobutane pyrimidine dimer photolyase of Xenopus laevis." FEBS J **272**(23): 6098-6108, 2005.

Thoma, F. "Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair." EMBO J **18**(23): 6585-6598, 1999.

Verma, I. M. and N. Somia "Gene therapy -- promises, problems and

prospects." Nature **389**(6648): 239-242, 1997.

Walker, I. H., P. C. Hsieh and P. D. Riggs "Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties." Appl Microbiol Biotechnol2010.

Waterworth, W. M., Q. Jiang, C. E. West, M. Nikaido and C. M. Bray "Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation." J Exp Bot **53**(371): 1005-1015, 2002.

Weber, S. "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." Biochim Biophys Acta **1707**(1): 1-23, 2005.

Wischermann, K., S. Popp, S. Moshir, K. Scharfetter-Kochanek, M. Wlaschek, F. de Gruijl, W. Hartschuh, R. Greinert, B. Volkmer, A. Faust, A. Rapp, P. Schmezer and P. Boukamp "UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes." Oncogene **27**(31): 4269-4280, 2008.

Wondrak, G. T., M. K. Jacobson and E. L. Jacobson "Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection." Photochem Photobiol Sci **5**(2): 215-237, 2006.

Yasui, A., A. P. Eker, S. Yasuhira, H. Yajima, T. Kobayashi, M. Takao and A. Oikawa "A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals." EMBO J **13**(24): 6143-6151, 1994.

Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto and S. Ishii "Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin." J Biol Chem **270**(43): 25328-25331, 1995.

Yi, Y., C. Yi, L. Qian, L. Min, C. Long, B. Linhan, Y. Zhirong and Q. Dairong "Cloning and sequence analysis of the gene encoding (6-4)photolyase from Dunaliella salina." Biotechnol Lett **28**(5): 309-314, 2006.

Zwick, M. B., L. L. Bonnycastle, K. A. Noren, S. Venturini, E. Leong, C. F. Barbas, 3rd, C. J. Noren and J. K. Scott "The maltose-binding protein as a scaffold for monovalent display of peptides derived from phage libraries." Anal Biochem **264**(1): 87-97, 1998.