Alysson Renato Muotri

Modulação da expressão do gene de reparo de DNA *xpa* por meio de
vetores genéticos em células humanas

São Paulo
-2001-

Alysson Renato Muotri

Modulação da expressão do gene de reparo de DNA *xpa* por meio de
vetores genéticos em células humanas

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na área de
Biologia/Genética.

Orientador:
Dr. Carlos Frederico Martins Menck

São Paulo
-2001-

Muotri, Alysson Renato
Modulação do gene de reparo de DNA
xpa por meio de vetores genéticos
em células humanas.

Número de páginas: 180

Tese de Doutorado – Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de
Biologia/Genética.

1.XPA; 2. Reparo de DNA; 3. Modulação Gênica.
I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências.
Departamento de Biologia/Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Aos meus pais,
Canio Muotri Neto e
Vitória Amabile Bortolato Muotri.
Obrigado pelas asas e pelos olhos!

À minha musa inspiradora,
Maria Carolina Nasser Marchetto.
Obrigado pelos mais livres movimentos!

Ao meu tutor e paciente amigo,
Carlos Frederico Martins Menck.
Incansável na busca do saber!

À minha fonte,
Pacientes *xeroderma pigmentosum*.
Obrigado pela tua pele!

...Investigue o motivo que o manda escrever;
examine se estende suas raízes pelos recantos
mais profundos de sua alma; confesse a si mesmo:
morreria, se lhe fosse vedado escrever? Isso
acima de tudo: pergunte a si mesmo na hora mais
tranquila de sua noite: “Sou mesmo forçado
a escrever?” Escave dentro de si uma resposta
profunda. Se for afirmativa, se puder contestar
àquela pergunta severa por um forte e
simples “sou”, então construa sua vida de
acordo com esta necessidade. Sua vida, até em sua
hora mais diferente e anódina, deverá
tornar-se sinal e o testemunho de tal
pressão...

Rainer Maria Rilke
Cartas a um jovem poeta, 1903
(trad. Paulo Rónai)

Não queiras ter Pátria.
Não dividas a Terra.
Não dividas o Céu.
Não arranques pedaços do mar.
Não queiras Ter.
Nasce bem alto,
Que as coisas todas serão tuas.
Que alcançarás todos os horizontes.
Que o Teu olhar, estando em toda parte
Te ponha em tudo,
Como um Deus.

Tu tens um medo:
Acabar.
Não vês que acabas todo o dia.
Que morres no amor.
Na tristeza.
Na dúvida.
No desejo.
Que te renovas todo o dia.
No amor.
Na tristeza.
Na dúvida.
No desejo.
Que és sempre outro.
Que és sempre o mesmo.
Que morrerás por idades imensas.
Até não teres medo de morrer.
E então serás eterno.

Cecília Meireles
Cânticos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, cientista criativo e perseverante, homem solidário e generoso, grande admirador da diversidade do mundo. Obrigado, pela oportunidade e concreta orientação.

Aos colegas de laboratório: Laila, Nem, Eliane, Soraia, Regina, Denise, Ciça, Lucymara, Vanessa, Douglas, Rodrigo G., Rodrigo R., Carolina Berra, Valéria, Marinalva, Carla, Keroninn, Karina, Wanessa, Renata M., Renata C. e Alice.

À Dra. Marie-Anne e alunos.

Ao Dr. Armando Moraes Ventura e alunos.

À Dra. Mari Cleide Sogayar e alunos.

À Dra. Lygia da Veiga Pereira e alunos.

Ao Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega e alunos.

Ao Dr. Gustavo Pessini Amarante-Mendes e alunos.

À Dra. Jacqueline e Fátima Jacysn.

Ao Dr. Towia Libermann, Dr. Luiz Fernando Celidonio Zerbini e Dra. Maria Beatriz Zerbini, afinal “PhD is not enough”.

Ao Dr. Hugo A. Armelin e Dra. Claudimara F.P. Lotfi.

À Dra. Kayo Okazaki e à Miriam Suzuki.

Aos funcionários Erotides Amâncio e Maria Helena de Oliveira.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia (IB-USP) e do Departamento de Microbiologia (ICB-USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos amigos de infância; Maurício Santoro (Gordo) e Fábio Mano (Olhos Juntos) e respectivas famílias.

Aos grandes amigos; Carlinha, Agnez, André, Marcílio, Carlo, Naka, Mariana, Gabriel, Dani, Kátia, Luciana, Ana, Giuliana e Léo-do-Rio.

Aos amigos de faculdade; Lica e Dani, Frank e Cíntia, Paulei, Rodrigo, Buda, Ju, Ângela, e ao pessoal da UNICAMP.

À família Marchetto; Marco, Teca e Sissa. “A vida é uma laranja!”.

A toda minha família, sempre presente.

Aos meus irmãos, Savério Canio Muotri e Ricardo Willian Muotri, companheiros solidários.

À minha avó, Dona Ana – suas orações e seu carinho são meu maior tesouro - e ao meu avô, Seu Ângelo (*in memoriam*) – que me pegava no colo, de gesso, mesmo eu sendo o mais birrento!

Aos meus pais Canio e Vitória pelo incentivo constante, concretizado desde o início no primeiro “kit” de química experimental.

A Carolzinha, minha Nega e minha Eurídice, que me ensinou a dançar, mesmo sem pernas; como se não houvesse ninguém olhando..., pela enorme ajuda no laboratório e durante a confecção desta tese, pelo companheirismo, pelo vinho e por Dionísio. Eternamente grato!

À todos, que de uma forma ou outra me ajudaram neste período. Apesar das barreiras que tive de transpor, nunca estive sozinho!

À vida, pelos pequenos buracos na parede da realidade, que me permitiram constatar a existência de outros universos, outras vidas...

Obrigado.

OM TAT SAT

Abreviações

aa	aminoácido
A, C, G T	adenina, citosina, guanina, timina.
Ad	adenovirus
AO/BE	acridine orange/brometo de etídio
AT	ataxia telangiectasia
ATP	adenosina trifosfato
BER	reparo por excisão de bases
BPE	extrato bovino pituitário
BSA	soro albumina bovino
cDNA	DNA complementar
CMV	citomegalovirus
CPE	efeito citopático
CPM	contagens por minuto
CPD	dímeros de pirimidina ciclobutano
CSA, CSB	síndrome de Cockayne grupo de complementação A e B
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DBP	proteína de ligação ao DNA
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DMEM	meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DEPC	dietilpirocarboneto
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
D.O.	densidade ótica
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiamino teracético
EGF	proteína fluorescente verde
EGFP	proteína fluorescente verde ‘melhorada’
ERCC	genes de complementação cruzada em reparo por excisão
EtBr	brometo de etídio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FACs	análise por citometria de fluxo
GGR	reparo genômico global
GTU	unidade de transferência gênica
³H-Tdr	timidina tritiada
hEGF	fator de crescimento epidermal humano recombinante
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
hHR23A/B	homólogos humanos de rad 23, A e B
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IgG	imunoglobulina do tipo G
IPTG	isopropil-1-thio- β -galactose
ITRs	seqüências terminais invertidas do genoma de adenovirus
KGM	meio de crescimento de queratinócitos

LB	Luria-Bertani
Mn	distribuição do número de moléculas ao longo do gradiente de sacarose
MOPS	ácido propanosulfônico 3-(N-Morfolino)
mRNA	RNA mensageiro
Mw	massa molecular
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NET	solução tampão contendo NaCl, EDTA e Tris-HCl
PBSA	tampão salina fosfato sem cálcio e magnésio
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	reação de polimerização em cadeia
PI	iodeto de propídeo
RT	transcriptase reversa
PM	peso molecular
PMSF	fenilmetil sulfonil fluoreto
Rad	grupo epistático de genes em leveduras
RFC	fator de replicação C
RNAse	ribonuclease
RPA	proteína replicadora A
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SSE	sítios sensíveis à enzima T4-endo V por 10 ⁷ Da de DNA
SSPE	solução salina-fosfato – EDTA
STET	solução de sacarose; Triton X, EDTA e Tris-HCl
SV40	vírus de símio tipo 40
TA	temperatura ambiente
TBE	tampão Tris-HCl-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TCR	reparo acoplado à transcrição
TE	tampão Tris-HCl-EDTA
TEMED	tetrametiletilenodiamina
T4-endoV	T4 endonuclease V
TFII-H	fator de transcrição da RNA polimerase IIIH
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTD	tricotiodistrofia
UDS	síntese de DNA não-programada
UV	ultravioleta
XPA-XPG	xeroderma pigmentosum do grupo de complementação A a G
XPV	XP variante

“Tudo
neste livro
Pode estar
Errado”.

(Manual do Messias)
Ilusões, Richard Bach
(Trad. Luzia Machado da Costa)

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

MATERIAIS E MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSSÃO

CONCLUSÕES

RESUMO

ABSTRACT

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS