Natália Cestari Moreno

Efeitos da luz UVA em células de pacientes com
Xeroderma Pigmentosum Variante

Effects of UVA light on Xeroderma Pigmentosum
Variant patient cells

São Paulo

2017

Natália Cestari Moreno

Efeitos da luz UVA em células de pacientes com
Xeroderma Pigmentosum Variante

Effects of UVA light on Xeroderma Pigmentosum
Variant patient cells

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos F. M.
Menck

Co-orientadora: Profa. Dra. Camila
Carrião M. Garcia

São Paulo

2017

RESUMO

Mais de 95% de luz ultravioleta (UV) que atinge a superfície da Terra corresponde ao comprimento de onda da luz UVA (315-400 nm). A luz UVA induz no DNA danos pela absorção direta e indireta dos fótons, bem como por intermédio de cromóforos. Pacientes com Xeroderma Pigmentosum Variante (XP-V) possuem mutações na DNA polimerase η (pol eta), que promove a síntese translesão dos danos induzidos pela luz solar. Na ausência dessa polimerase há aumento da mutagênese, provável causa de câncer de pele em pacientes XP-V. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos de indução de danos no genoma e mutagênese por luz UVA, em células derivadas desses pacientes. Os resultados indicam que a exposição à luz UVA resultou em maior sensibilidade de células XP-V comparadas à linhagem controle. Os níveis de fosforilação da histona H2AX (gerando γ H2AX - indicador de indução de danos no genoma) e detecção de danos diretos e indiretos no DNA apresentou um aumento significativo em células XP-V irradiadas com luz UVA. Curiosamente, na ausência de pol eta houve uma redução na capacidade de remoção das lesões formadas. Além disso, a irradiação com luz UVA causou forte bloqueio de replicação do DNA e parada do ciclo celular em fase S em células XP-V, desencadeando importantes respostas mediadas por ATR/Chk1. Surpreendentemente, o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) resultou em diminuição da sensibilidade celular, dos níveis de γ H2AX, da parada de forquilha de replicação e do ciclo celular, reduziu os efeitos citotóxicos da inibição de ATR, melhorou o reparo de lesões no DNA e preveniu a carbonilação de proteínas em células XP-V irradiadas com luz UVA. Investigamos também a indução de mutagênese nas células irradiadas com luz UVA, através de sequenciamento de exoma de clones celulares. Os dados indicaram um aumento significativo da mutagênese em células XP-V irradiadas comparadas a células controle, e pela avaliação dos tipos de mutações encontradas verificamos uma frequência bastante alta de transições C>T, provavelmente como consequência de replicação errônea de dímeros de pirimidina. Entretanto, também identificamos indução significativa de transversões C>A, provavelmente devido a lesões oxidadas no genoma. Curiosamente, ao compararmos células XP-V com células controle detectamos um aumento desse último tipo de mutação na ausência de pol eta, provavelmente devido a lesões endógenas, produzidas pela oxidação do DNA. Além disso, análises *in silico* mostraram que células XP-V irradiadas com UVA apresentaram assinatura mutacional similar ao observado para tumores de pele. Os dados claramente indicam que células XP-V são sensíveis a irradiação com UVA e que os danos promovidos no DNA, incluindo aqueles causados por estresse oxidativo, desencadeiam respostas celulares e mutagênese nesses pacientes. Assim, além de apontar que UVA pode gerar efeitos

deletérios na pele de pacientes XP-V, nossos dados também contribuem para a compreensão de como esses comprimentos de onda podem atuar em células humanas em geral.

ABSTRACT

More than 95% of ultraviolet-light (UV) that reaches the Earth surface corresponds to UVA wavelengths (315-400 nm). UVA-light induces DNA damage through direct and indirect absorption of photons, as well as, intermediated by chromophores and by oxidation mechanisms. Xeroderma Pigmentosum Variant (XP-V) patients are defective in DNA polymerase η (pol eta) that performs translesion synthesis of sunlight induced DNA damage. Absence of pol eta results in increased mutagenesis, which is probably responsible for high frequency of skin cancer in XP-V patients. The goal of this work was to characterize the mechanisms of UVA-induced genome DNA damage and mutagenesis in cells derived from these patients. The results indicate that UVA irradiation increased cell death of XP-V compared to control cell line. The phosphorylation of the histone H2AX (generating γ H2AX, an indicator of genotoxic stress) and DNA damage was highly increased in UVA irradiated XP-V cells. Curiously, however, in the absence of pol eta, there was a reduction in the capacity of cells to remove DNA damage from genome. Moreover, UVA irradiation triggered strong DNA synthesis blockage and cell cycle arrest in S phase, resulting in important responses mediated by the ATR/Chk1 pathway in XP-V cells. Interestingly, the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) resulted in decreased cell sensitivity, γ H2AX levels, fork stalling and cell cycle arrest, reduced the cytotoxic effect of ATR inhibition, improved DNA repair and prevented the protein carbonylation in XP-V cells irradiated with UVA. The mutagenesis by UVA-light was also investigated by exome DNA sequencing of cellular clones. The data indicated a significative increase of mutagenesis in XP-V irradiated cells compared to control cells, and the identification of mutation types indicated a high increase of C>T transitions, probably as result of error-prone replication of pyrimidine dimers. Nevertheless, the induction of C>A transversions were also detected, probably due to oxidized DNA damage. Curiously, when XP-V and control cells were compared, in the absence of irradiation, these transversions were also detected, maybe due to endogenous oxidation of DNA. In addition, *in silico* analyses showed that UVA-irradiated XP-V cells had a mutation signature similar to the observed for skin cancer. The data demonstrate XP-V cells are sensitive to UVA-light and DNA damage, including by oxidative stress, trigger cell responses and induce mutagenesis in these patients. Therefore, besides showing that UVA-irradiation may generate deleterious effects in the skin of XP-V patients, the data also contribute to understand how these light wavelengths may damage human cells in general.

CAPÍTULO I – Introdução geral e objetivos gerais

1. Introdução geral

1.1 DNA como alvo da luz ultravioleta A (UVA)

O genoma das células está sujeito à ação de uma extensa variedade de agentes endógenos e exógenos que induzem danos ao DNA. Estes danos resultam em mudanças estruturais nas bases nitrogenadas, podendo resultar em anéis exocíclicos e cadeias lineares longas, formação de adutos, ou mesmo quebras na cadeia fosfodiéster. Cisplatina, mitomicina c, lesões geradas por processos redox e os induzidos por luz ultravioleta (UV) são exemplos de agentes que induzem modificações no DNA. Os danos podem gerar sérias consequências biológicas, uma vez que podem prejudicar processos importantes para o metabolismo celular como a replicação ou transcrição, eventualmente ocasionando mutações ou até mesmo morte celular. Essas consequências por sua vez são responsáveis por processos deletérios no organismo como câncer e envelhecimento (SCHARER, 2003; FRIEDBERG et al., 2004; SCHUCH et al., 2017).

Devido sua importância ambiental, a luz solar é um importante exemplo de agente exógeno que pode ocasionar lesões no DNA, uma vez que praticamente todo ser vivo está exposto a este agente genotóxico. A luz UV é o componente mais prejudicial e mutagênico do espectro da radiação solar (RAVANAT et al., 2001). O espectro da radiação UV é classificada em três faixas de comprimentos de onda: UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm) (MCMILLAN et al., 2008). Os comprimentos de ondas inferiores a 290 nm são filtrados pela camada de ozônio existente na estratosfera da Terra. Sendo assim, somente 5 a 10% de luz UVB ultrapassa essa barreira. Cerca de 95% da emissão de UV da luz solar natural que atinge a Terra é a UVA (SAGE et al, 2012; RUNGER e KAPPES, 2008). Assim como UVB, UVA é capaz de ultrapassar a barreira natural da pele causando danos nos tecidos e na molécula de DNA (MCMILLAN et al., 2008).

O impacto da luz UVA causando prejuízos à saúde não é bem conhecido, porque apesar de penetrar a pele humana com mais eficiência que a luz UVB, ela é pouco absorvida pelo DNA. No entanto, cada vez mais trabalhos têm demonstrado a sua participação na indução de danos em membranas, lipídios, proteínas e DNA

(SAGE et al., 2012; WANG et al., 2001; SETLOW et al., 1993). Levando em consideração trabalhos que avaliam a mutagênese induzida UVB e UVA, a radiação UV foi classificada como carcinógeno de classe I pela Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO), sendo, portanto, um agente ambiental reconhecidamente carcinogênico para humanos (GHISSASSI et al., 2009; RUNGER et al., 2012). Os mecanismos pelos quais a luz UVA induz mutações e câncer de pele, porém, continuam em debate (SAGE et al., 2012; RUNGER et al., 2012).

A luz UVA pode causar danos no DNA através da absorção direta dos fótons pelas bases formando dímeros de pirimidina (TYRRELL e KEYSE, 1990). Tyrrell em 1973 mostrou pela primeira vez a indução de dímeros de pirimidina em *Escherichia coli* com o uso de uma fonte de irradiação com comprimento de onda de 356 nm (Tyrrell, 1973). Mais recentemente, essa descoberta tem sido confirmada, com uma série de trabalhos que demonstram a indução de dímeros do tipo dímeros de pirimidina ciclobutano (do inglês, *cyclobutane pyrimidine dimers* - CPD) por luz UVA em DNA isolado (MATSUNAGA et al., 1991; PERDIZ et al., 2000; SCHUCH et al., 2009; YAGURA et al., 2017), em células de ovário de hamster chinês (PERDIZ et al., 2000; ROCHETTE et al., 2003; DOUKI et al., 2003), fibroblastos (COURDAVAULT et al., 2004; CORTAT e GARCIA et al., 2013) e queratinócitos humanos (COURDAVAULT et al., 2004; GUVEN et al., 2015) e em pele humana (BURREN et al., 1998; MOURET et al., 2006) e os correlacionando com efeitos citotóxicos e mutagênicos (ROBERT et al., 1996; AGAR et al., 2004; KAPPES et al., 2006; RUNGER et al., 2012; CORTAT e GARCIA et al., 2013). Além de CPD, trabalhos do nosso grupo também evidenciam que UVA pode induzir também pirimidina (6-4) pirimidona (do inglês, *pyrimidine (6-4) pyrimidone* – 6-4 PP) detectados apenas em condições de ausência de reparo de DNA (SCHUCH et al., 2009; CORTAT e GARCIA et al., 2013). Esses são os dois fotoprodutos principais induzidos por luz UVC e UVB, sendo, portanto, bastante estudados e, reconhecidamente, provocam distorções na dupla hélice do DNA, criando assim, barreiras físicas para as polimerases transcricionais e replicativas (LO et al., 2005).

Os fotoprodutos CPDs são formados após a absorção da energia da luz UV por bases pirimidínicas adjacentes, através do qual passam a ficar ligadas covalentemente pela formação de um anel ciclobutano entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas bases nitrogenadas (figura 1A e B) (RAVANAT et al., 2001).

Assim como os CPDs, os fotoprodutos 6-4 PPs são originadas por uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, porém de modo não cíclico, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3', respectivamente (figura 1A e B). Os 6-4 PPs que exibem uma citosina em seu terminal 5' podem dar origem a um terceiro fotoproduto através de sua conversão em isômero Dewar (DewPPs). A isomerização à Dewar acontece após exposição a comprimentos de onda da luz UVA (COURDAVALT et al., 2005; CHADWICK et al., 1995; DOUKI e SAGE, 2016).

A luz UVA pode ainda induzir danos através de mecanismos indiretos, que em geral leva à oxidação do DNA (SAGE et al., 2012; KIELBASSA et al., 1997). Os mecanismos indiretos responsáveis por ocasionar danos no DNA e efeitos genotóxicos são característicos de comprimentos de onda maiores que 280 nm, como é o caso da UVA (JONES et al., 1987) e UVB (RUNGER et al., 2012). A oxidação se dá através da produção de espécies reativas no interior das células, como por exemplo as Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species* - ROS). ROS incluem radicais livres derivados de oxigênio como o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\text{OH}^{\cdot}$), e ainda espécies não-radicais, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (HALLIWELL e ARUOMA, 1991).

Um dos mecanismos mais conhecidos para a geração de espécies reativas intracelulares é o de fotossensibilização. A célula possui algumas moléculas que podem atuar como fotossensibilizadores endógenos, como por exemplo, a vitamina B12, FAD e riboflavinas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O mecanismo de fotossensibilização pode ocorrer através duas vias: a reação do tipo I envolve um fotossensibilizador endógeno excitado que abstrai elétrons ou H^+ de um substrato intracelular e transfere essa energia para o DNA. Ou através da reação do tipo II que envolve transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular gerando o $^1\text{O}_2$, que por sua vez oxida o DNA (DI MASCIO et al., 1990; HALLIWELL e ARUOMA, 1991; OLIVEIRA et al., 1992; EVANS et al., 2004;).

Reações de oxidação no DNA podem ocorrer em diferentes pontos da molécula, como nas bases e na ribose. A guanina é o substrato que possui o menor potencial de redução (STEENKEN e JOVANOVIĆ et al., 1997), sendo o alvo preferencial sobre as outras bases (GIESE, 2000). A luz UVA pode gerar vários tipos de modificações no DNA por meio de mecanismos oxidativos, como por exemplo, oxidação de bases originando 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) e 2,6-diamino-4-

hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua), quebras de fita simples ou mesmo de fita dupla, sítios abásicos e ligações cruzadas (*crosslinks*) entre DNA-DNA e DNA-proteínas (WAMER et al., 1997; CADET et al., 2005; HATTORI-NAKAKUKI et al., 1994; PEAK e PEAK, 1991).

Figura 1 – Estrutura dos principais produtos de modificação no DNA (CPD, 6-4 PP e 8-oxoG) induzidos por luz UVA. A) após a absorção da luz UVA, bases pirimidínicas adjacentes podem se ligar covalentemente de modo cíclico em CPD e não cíclico em 6-4 PPs. B) CPD e 6-4 PP formam distorções volumosas no DNA que resultam em bloqueio das polimerases replicativas e de transcrição. C) 8-oxoG formada após a oxidação da guanina através de reações de fotossensibilização do tipo I ou II. As figuras foram adaptadas de Rastogi et al., 2010, Batista et al., 2009 e Schuch et al., 2013.

A 8-oxoG é frequentemente utilizada como biomarcador para identificar estresse oxidativo (figura 1C) (NEELEY e ESSIGMANN, 2006). Esta lesão é particularmente nociva podendo resultar em emparelhamento errôneo com a adenina e gerar a transversão C>A (G:C>T:A), quando estiver em conformação *syn*. Assim, devido às características estruturais desta lesão, o processo de replicação a torna extremamente mutagênica (CARLSON et al., 2005; DAVID et al., 2007).

1.2 Resposta a danos no DNA induzidos por luz UV: reconhecimento, reparo e tolerância

As células são equipadas com vários mecanismos anti-mutagênicos que evitam a formação de mutações nos locais onde o DNA sofreu algum tipo de dano e buscam garantir a sobrevivência de células danificadas. Estes mecanismos incluem basicamente a parada do ciclo celular, reparo ou tolerância da base danificada e em último caso morte celular (RUNGER et al., 2012). Esses mecanismos são coletivamente chamados de Resposta a Danos no DNA (do inglês, *DNA Damage Response* – DDR).

A fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ H2AX) tem um papel chave no DDR, sinalizando para controle do ciclo celular e recrutamento de processos de reparo. Apesar de ter sido descrita como um marcador de duplas quebras no DNA (CLEAVER et al., 2011), a γ H2AX pode ser formada simplesmente por modificações na cromatina devido ao processamento do DNA lesado (CLEAVER, 2011). A participação desta histona na sinalização de DDR está em sua capacidade de aumentar a acessibilidade do DNA, levando ao recrutamento e acúmulo de proteínas de DDR no DNA. Sua fosforilação cria um sinal epigenético que é reconhecido pelas proteínas de DDR, modulando a resposta de *checkpoint*, permitindo que o DNA possa ser reparado. A fosforilação de H2AX é feita por proteínas da família PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases*), bem como por outras proteínas como, por exemplo, JNK. Por ela ter esse papel importante no DDR, essa histona vem sendo frequentemente utilizada como biomarcador de indicativo de estresse genotóxico (figura 2) (MAH et al., 2010; CLEAVER, 2011; LIU et al., 2012; GHOSAL e CHEN, 2013). Vários trabalhos têm relacionando a fosforilação de H2AX como indicativo de indução de estresse genotóxico por luz UV (LIMOLI et al., 2002; GIRARD et al., 2008; DESPRAS et al., 2010; REVET et al., 2011; ELVERS et al., 2012; QUINET et al., 2014; ANDRADE-LIMA et al., 2015).

As quinases da família PI3K, ataxia telangiectasia mutada (ATM), ATM e Rad3 relacionada (ATR) e proteína quinase DNA dependente (DNA-PK) podem ser ativadas no DDR. ATM é especialmente ativada quando o dano no DNA leva a uma dupla quebra (do inglês, *Double Strand Breaks* – DSB) (LUKAS et al. 2011). Por outro lado, ATR é ativada quando há presença de quebra de fita simples (do inglês, *Single Strand Breaks* – SSB) e atua junto com a proteína de replicação A (do inglês, *Replication Protein A* – RPA) que se acumula e estabiliza regiões simples fita do

DNA (CIMPRICH e CORTEZ, 2008; JONES e PETERMANN, 2012). Em resposta aos danos induzidos por luz UV, ATR é ativada e desencadeia a fosforilação de outras proteínas quinases, como por exemplo, a proteína *Checkpoint 1* (Chk1). A fosforilação de Chk1 inibe a ativação de novas origens de replicação, aumenta o tempo de parada da forquilha de replicação, induz parada de ciclo celular e promove a estabilização de regiões de fita simples de DNA (CIMPRICH e CORTEZ, 2008; DESPRAS et al., 2010; ELVERS et al., 2012). Esse processo é importante principalmente para que os sistemas de reparo ou de tolerância atuem no local do dano e a forquilha de replicação parada não entre em colapso, o que pode resultar em morte celular. No entanto, caso as células acumulem uma grande quantidade de lesões, outros sítios podem ser fosforilados ativando mecanismos de morte celular programada (figura 2) (MIYAJI e MENCK, 1996; LAKIN e JACKSON, 1999; ZHOU e ELLEDGE, 2000; KASTAN e BARTEK, 2004; BRANZEI e FOIANI, 2008; MARECHAL e ZOU, 2013).

Figura 2 - Resposta à Danos no DNA (DDR) induzido por luz UVB e UVC. A histona H2AX pode ser fosforilada em resposta à danos no DNA. A fosforilação é feita por proteínas da família PI3K (ATR, ATM e DNA-PK). Em respostas aos danos induzidos por luz UV, a quinase ATR pode fosforilar outras proteínas, como por exemplo, p53 e Chk1 para que ocorra parada de ciclo celular, reparo, tolerância de danos (*bypass*) e/ou morte celular. No entanto, o DDR induzido por luz UVA ainda é uma questão em aberto.

As células possuem diversos mecanismos de reparo de DNA que atuam nos diferentes tipos de dano. Bases oxidadas, por exemplo, promovem baixas distorções na hélice do DNA e são reparadas por glicosilases específicas do Reparo por Excisão de Bases (do inglês, *Base Excision Repair* - BER). Já para reparar os danos gerados por UV que causam distorções maiores (tais como CPDs e 6-4PPs), a célula dispõe principalmente do mecanismo conhecido como Reparo por Excisão de Nucleotídeos (do inglês, *Nucleotide Excision Repair* - NER) (FRIEDBERG et al, 2006).

NER é um processo de reparo bastante flexível atuando em vários tipos de lesão que promovem distorções na dupla-hélice. Esse processo apresenta duas subvias com diferentes modos de reconhecimento da lesão: o Reparo do Genoma Global (*Global Genome Repair* - GGR) e o Reparo Acoplado à Transcrição (do inglês, *Transcription Coupled Repair* - TCR). De um modo geral, NER atua: 1) reconhecendo a lesão, que no caso da GGR é feito pelo complexo proteico XPC-HR23B, que além de iniciar e se ligar à lesão, distorce a dupla hélice de DNA e recruta as demais proteínas que atuam no NER e DDB-XPE que aumenta a afinidade de XPC-HR23B por certos tipos de lesão, como o CPD. Já TCR é iniciado pelo bloqueio da transcrição pela RNA polimerase II frente às lesões e recrutamento das proteínas CSA e CSB para o deslocamento da RNA polimerase II; 2) abrindo a dupla hélice, por meio de duas helicases, XPB e XPD, que fazem parte do TFIIH (complexo proteico e fator de transcrição também envolvido no NER), juntamente com a RPA-XPA que garantem estabilização às proteínas; 3) fazendo incisões da fita danificada e retirando o oligonucleotídeo alguns nucleotídeos de distância nos dois lados da lesão, pela ação das endonucleases XPG e ERCC1-XPF, 4) sintetizando um novo filamento pela ação da RPA, das DNA polimerases δ e ϵ , RFC e PCNA e 5) ligação do terminal 5' do filamento recém sintetizado à sequência original pela DNA ligase I (figura 3) (STARESINCIC et al., 2009; BERRA et al., 2006; COSTA et al., 2003).

Um evento muito importante decorrente das lesões provocadas por luz UV é a parada da forquilha de replicação. Lesões que param a forquilha são muito perigosas porque podem levar quebra de fita dupla e consequentemente morte celular (BATISTA et al., 2009). Os dímeros de pirimidina promovem grandes distorções na molécula de DNA e não podem ser replicados pela DNA polimerase replicativa. As DNA polimerases replicativas (família B: pol α , pol δ , pol ϵ), possuem

o sítio catalítico pequeno e acomodam a base em sua estrutura normal, o que confere a elas alta fidelidade, processividade e atividade de edição (do inglês, *proofreading*). Deste modo, quando encontram a lesão elas param e uma série de eventos acontecem para que a forquilha não entre em colapso (GHOSAL e CHEN, 2013).

Figura 3 – O Reparo por Excisão de Nucleotídeos repara dos danos induzidos por luz UV. A figura (adaptada de Menck e Munford, 2014) mostra a ação de NER em um dano induzido por luz UV. Esse mecanismo de reparo é iniciado pelo reconhecimento da lesão no genoma pelo GGR (XPC, XPE e HR23B), ou então pela parada na polimerase de transcrição que por sua vez vai iniciar o TCR (CSA e CSB). Após a etapa de reconhecimento as duas subvias seguem iguais. Em resumo, o DNA é aberto no local do dano (XPB e XPD) e o complexo de reparo é estabilizado (RPA-XPA). O segmento de DNA danificado é retirado (XPF e XPG) e um novo fragmento de DNA é sintetizado. Figura adaptada de Menck e Munford, 2014.

Um evento muito importante decorrente das lesões provocadas por luz UV é a parada da forquilha de replicação. Lesões que param a forquilha são muito perigosas porque podem levar quebra de fita dupla e consequentemente morte celular (BATISTA et al., 2009). Os dímeros de pirimidina promovem grandes distorções na molécula de DNA e não podem ser replicados pela DNA polimerase

replicativa. As DNA polimerases replicativas (família B: pol α , pol δ , pol ϵ), possuem o sítio catalítico pequeno e acomodam a base em sua estrutura normal, o que confere a elas alta fidelidade, processividade e atividade de edição (do inglês, *proofreading*). Deste modo, quando encontram a lesão elas param e uma série de eventos acontecem para que a forquilha não entre em colapso (GHOSAL e CHEN, 2013).

Para controlar as forquilhas paradas, além do reparo as células dispõem de um mecanismo de tolerância a danos, conhecido como Síntese Translesão (do inglês *Translesion Synthesis* – TLS). As proteínas que atuam em TLS pertencem em geral à DNA polimerases da família Y (pol η , pol ι , pol K e REV1). Diferentemente das polimerases replicativas, as polimerases de TLS possuem um sítio ativo maior que acomoda lesões volumosas e um dedo pequeno adicional que provavelmente auxiliam em sua estabilização no DNA danificado. O fato dessas polimerases terem esse sítio mais relaxado para acomodar grandes lesões resulta em menos contato com o DNA íntegro. Isso faz com que essas polimerases tenham uma baixa processividade e fidelidade, e ainda percam a atividade *proofreading* (FRIEDBERG, 2005; WANG e WOODGATE, 2007; WATERS et al., 2009; SALE et al., 2012).

Como comentado, a DNA polimerase replicativa para quando encontra a lesão. Em consequência, o DNA simples fita (do inglês, *single strand DNA* - ssDNA) frente a lesão é coberto pela RPA que é sinal para ubiquitinação de PCNA (do inglês, *Proliferation Cell Nuclear Antigen*). A modificação de PCNA é o principal regulador da via de tolerância à danos. A monoubiquitinação de PCNA (mediada principalmente por E2-E3/Rad6 e Rad18) faz com que ela passe a ter afinidade pelas polimerases de TLS, uma vez que possuem um sítio de ligação à ubiquitina. A DNA polimerase de TLS assume a replicação e insere bases frente ao DNA lesionado. Como ela tem baixa processividade, assim que ela completa o *bypass* da lesão a PCNA é desubiquitinada e a DNA polimerase replicativa volta a replicar o DNA após a lesão (figura 4) (MENCK e MUNFORD, 2014; GHOSAL e CHEN, 2013; FRIEDBERG, 2005). A TLS é um processo muito importante do ponto de vista mutagênico, porque as polimerases dessa via de tolerância podem realizar o *bypass* de maneira livre de erros ou propensa à erros. O que vai determinar a fidelidade do processo é a natureza da lesão e a polimerase que está disponível para realizar o *bypass*. Com relação aos danos induzidos por luz UV, a polimerase η (pol eta) é a

polimerase que consegue fazer o *bypass* com relativa fidelidade (FRIEDBERG, 2005; LOEB e MONNAT, 2008).

Figura 4 – Síntese de translesão do dano induzido por luz UV. Um importante mecanismo de tolerância de danos e de controle da mutagênese. A DNA polimerase replicativa não consegue passar pelo dano induzido por UV, sendo assim substituída por uma polimerase de TLS, como por exemplo, a pol eta. Para que essa troca ocorra, PCNA é monoubiquitinada e passa a ter afinidade pela polimerase de TLS que insere bases de DNA frente ao local lesionado. Devido sua baixa processividade, assim que completa o *bypass* da lesão, a PCNA é desubiquitinada e então a DNA polimerase replicativa volta a replicar o DNA após a lesão. Figura adaptada de Menck e Munford, 2014.

1.3 Xeroderma Pigmentosum Variante: uma doença decorrente de mutações na pol eta

Apesar das células eucarióticas contarem com NER que é um acurado sistema de reparo, deficiências genéticas nas proteínas dessa via podem ocorrer dando

origem a síndromes com altos níveis de tumores de pele, como é o caso de Xeroderma Pigmentosum (XP). XP foi reportada pela primeira vez em 1874 e relacionada com sistema de reparo defeituoso somente no final de 1960 (CLEAVER, 1968).

XP é uma doença autossômica recessiva rara e hereditária, no qual as células não conseguem remover os danos no DNA causados por luz UV. Os pacientes com essa síndrome possuem incidência de tumor cerca mil vezes maior que a média da população e as principais características da XP são a forte pigmentação e incidência de vários cânceres na pele em áreas expostas ao sol (figura 5) (CLEAVER, 2000; KRAEMER et al., 2007; KRAEMER e DIGIOVANNA, 2012).

Figura 5 – Exemplo de paciente com Xeroderma Pigmentosum. Os pacientes com deficiências em uma das proteínas de NER ou em pol eta possuem alta sensibilidade à luz solar decorrendo em alta incidência de câncer de pele em áreas expostas ao sol. Adaptado de Kraemer et al.; 2007.

Esta síndrome é decorrente de mutações em um dos sete genes que codificam as proteínas (XP-A a XP-G) que participam de NER. XP pode ainda se apresentar em uma forma variante (XP-V), que apresenta NER normal, porém possui mutações na pol eta. XP-V é o primeiro exemplo de doença humana causada por um defeito na replicação do DNA danificado (PAGES e FUCHS, 2002). A pol eta é produto do gene *POLH*, compreende onze exons, 713 aminoácidos e sua principal função é realizar corretamente o *bypass* do DNA (GRATCHEV et al., 2003; YUASA et al., 2000), contribuindo para a proteção de células humanas contra os efeitos potencialmente mutagênicos da radiação UV (WANG et al., 2007). A ausência da pol eta explicaria o aumento de mutações em células XP-V após exposição a luz solar (WANG et al., 2007; PAGES e FUCHS, 2002).

Como comentado, a principal função da pol η é replicar o DNA contendo lesões e através de uma replicação relativamente correta suprime a formação de câncer de pele pela redução de mutagênese induzida por UV (MASUTANI et al., 1999; VAN STEEG e KRAEMER, 1999; MENCK et al., 2007; SPIVAK e HANAWALT, 2014; MENCK e MUNFORD, 2014). Nesses pacientes a replicação no DNA é interrompida em locais que sofreram danos, principalmente devido exposição à luz UV, e a síntese do novo filamento de DNA oposta às lesões é propensa à erros porque o *bypass* é realizado por outra DNA polimerase de sua família, muito provavelmente pol ι (pol iota), que possui baixa fidelidade na inserção de bases na fita complementar, o que pode levar a fixação de numerosas mutações no DNA e ocasionar desenvolvimento do câncer de pele (MASUTANI et al., 1999; VAN STEEG e KRAEMER, 1999).

A pol η pode realizar o *bypass* de CPD, 6-4 PP e de bases oxidadas, como por exemplo a 8-oxoG, porém ela tem grande afinidade à CPDs formadas entre duas timinas. Na 8-oxoG, dependendo da conformação *syn* ou *anti*, a pol η pode inserir A ou C, respectivamente (CARLSON et al., 2005; DAVID et al., 2007). Apesar dela poder fazer uma TLS propensa erros nesta lesão, ela é mais eficiente que outras polimerases e sua substituição aumenta a mutagênese dessas lesões em células de XP-V (WANG et al., 2007; SHIBUTANI et al., 1991; HARACSKA et al., 2000; VAISMAN et al., 2003; SAGE et al., 2012; IKEHATA et al., 2014; KANAO et al., 2015).

Desde a descoberta da pol η , um considerável número de mutações neste gene tem sido associado com o fenótipo XP-V. Estas mutações incluem substituição de pares de bases, pequenas inserções e deleções resultando em mudança no quadro de leitura ou término prematuro da proteína (GRATCHEV et al., 2003; TANIOKA et al., 2007; MUNFORD e CASTRO et al, 2017).

1.4 Mutagênese induzida por luz UV na presença e na ausência da pol η

Está bem estabelecido que a luz UV solar induz a formação de diferentes tipos de danos no DNA, que podem resultar em mutações (CADET et al., 2005). As principais lesões na molécula de DNA induzidas por radiação UV resultam em “assinaturas mutacionais” que podem caracterizar cada tipo de alteração. Por exemplo, a assinatura de UVB e UVC é definida como a transição de C>T que são

formadas principalmente em sítios de dímeros de pirimidina, coincidentes com os principais fotoprodutos de luz UV, CPD e 6-4 PP (BRASH et al., 1987; DOUKI et al., 2003; KAPPES et al., 2006; HERMAN et al., 2014). Como comentado anteriormente, a luz UV pode induzir também a 8-oxoG, no qual é caracterizada por induzir a transverso de G>T (ou C>A) (SHIBUTANI et al., 1991; GROLLMAN e MORIYA, 1993; PERSSON et al., 2002; CARLON e WASHINGTON, 2005; DAVID et al., 2007).

Trabalhos que avaliaram a mutagênese da luz UVA reportaram a indução da transverso C>A (DROBETSKY et al., 1995; PERSSON et al., 2002; BESARATINIA et al., 2007). No entanto, a indução da transição C>T foi encontrada na maioria dos trabalhos, sugerindo que os dímeros de pirimidina são as principais lesões pró-mutagênicas induzidas por UVA (ROBERT et al., 1997; KRANEN et al., 1997; IKEHATA et al., 2003; ROCHETTE et al., 2003; AGAR et al., 2004; COURDAVAULT et al., 2004; PFEIFER et al., 2005; KAPPES et al., 2006). Sendo assim, essa assinatura vem sendo discutida como característica da radiação UV em geral e não especificamente de UVB, uma vez que também foi observada no gene *p53* de queratinócitos irradiados com luz UVA (PERSSON et al., 2002), porque tem sido encontrada na maioria dos cânceres de pele não melanoma (BRASH et al., 1991; GIGLIA-MARI e SARASIN, 2003), bem como em melanoma (GREENMAN et al., 2007; PLEASANCE et al., 2009) e porque essa transição raramente é encontrada após a exposição a outros carcinógenos (WIKONKAL e BRASH, 1999).

Como discutido anteriormente, os fotoprodutos CPDs e 6-4PPs são normalmente reparados pela via NER, sendo que os 6-4PPs são reparados pelas células poucas horas após a irradiação, enquanto CPDs levam mais tempo para serem reparados (COSTA et al., 2003). Por esse motivo, acredita-se que as CPDs sejam as principais responsáveis pela mutagênese da luz UV. Os fotoprodutos TT-CPDs são encontrados com mais frequência comparados aos TC-CPDs e CC-CPDs após UVB e UVC (DOUKI e CADET, 2001; YOU et al., 2001; STARY et al., 2003), no entanto isso acontece de maneira inversa após irradiação com luz UVA (KAPPES et al., 2006).

Experimentos *in vitro* indicam que a pol eta insere acuradamente duas A em TT-CPD. Nos dímeros contendo TC e CC ela insere G corretamente na frente do C seguida de correta extensão pela pol ζ (pol zeta) inserindo A ou G, em T e C respectivamente (YU et al., 2001). Por outro lado, a pol eta é incapaz de realizar o

bypass completo de TT-6-4PPs. Neste caso, a pol eta insere um G oposto ao 3'T e pol zeta um A oposto ao 5'T, dando origem a uma transição T>C (JOHNSON et al., 2001). A 3'C dentro dos dímeros 5'CC3' e 5'TC3' é altamente mutagênica, sendo assim, as mutações induzidas por luz UV ocorrem na maioria dos casos nestes locais (YOU et al., 2001). Há ainda evidências de que a luz UV induza mais mutações nos CPDs contendo C (STARY et al., 2003). Uma explicação para isso é que a citosina dentro de um dímero de pirimidina é muito instável e pode facilmente ser desaminada à uracila. O dímero de pirimidina também pode conter uma pirimidina metilada, neste caso a desaminação resulta em T. Em ambos os casos, a pol eta insere corretamente A frente a U ou T. Em seguida, durante a replicação essa A será pareada com T, ocorrendo então a transição de C>T (IKEHATA e ONO, 2011).

O papel da pol eta no controle da mutagênese induzida pela luz solar é inquestionável visto o fenótipo de pacientes XP-V para o aumento do desenvolvimento de tumores de pele. Também já foi demonstrado que o nível de mutações induzidas por UVC em vetores foi restaurado ao nível normal quando células XP-V são complementadas com o gene POLH, que codifica a pol eta. Essa observação mostra que o *bypass* de dímeros de pirimidina, com alta fidelidade, realizado pela pol eta contribui para a supressão da mutagênese em células humanas (STARY et al., 2003). Na ausência da pol eta, o *bypass* das lesões induzidas por luz UV é realizado por uma ou mais polimerases da mesma família da pol eta. Acredita-se que principal polimerase que substitui a pol eta é a pol iota, que realiza, *in vitro*, o *bypass* dos dímeros com ou sem a ajuda de pol zeta dependendo da lesão e da sequência contexto (ZHANG et al., 2001; VAISMAN et al., 2003). Pol iota faz o *bypass* de TT-CPD e TU-CPD com alta taxa de erro, inserindo G ou T no 3'T do CPD e A frente a U, porém a eficiência de incorporação do nucleotídeo frente a base danificada aumenta com a adição de PCNA, RFC e RPA (HARACSKA et al., 2001; VAISMAN et al., 2006; WANG et al., 2007). Por outro lado, faz acuradamente a síntese translesão de TT-6-4 PPs (VAISMAN et al., 2003). As inserções errôneas dão origem a T>A, T>C e C>T. Na ausência da pol eta essas polimerases poderiam ainda inserir preferencialmente A na frente da lesão, não importando de qual tipo seja (IKEHATA e ONO, 2011), isso justificaria o aumento da transição C>T em dímeros de pirimidina e G>T na 8-oxoG após a exposição a luz UV. Além disso, a reduzida habilidade de células XP-V em realizar o *bypass* da lesão seria uma

explicação alternativa para o aumento da C desaminada e para o aumento de mutações C>T (CHOI e PFEIFER, 2005).

Em células XP-V já foi reportado, além de C>T (STARY et al., 2003; HERMAN et al., 2014), o aumento na proporção de mutações em fotoprodutos contendo T, tais como, transversões de T>A (MCGREGOR et al., 1999), altos níveis de transversões de C>A (WANG et al., 1993; MCGREGOR et al., 1999) e G>C (WATERS et al., 1993). No entanto, até o momento não há relatos sobre a mutagênese de células XP-V expostas a luz UVA especificamente. O que se conhece sobre a mutagênese da luz UV em células XP-V se restringe a UVC e UVB, apesar de muito informativo com relação a mecanismo de indução de mutação a falta de trabalhos que investiguem a mutagênese de UVA faz com que se subestime seus efeitos.

Trabalhos sugerem que a pol eta também realiza o *bypass* de outros tipos de lesões que incluem a O⁴-metil timina e O⁶-metil guanina (GLICK, 2001), adutos de acetilaminofluoreno (MASUTANI, 2000), cisplatina e oxaplatina (BASSETT et al., 2002), bem como realiza com certa eficiência o *bypass* da lesão mais comumente gerada por processos redox, a 8-oxoG, desenvolvendo um papel importante na supressão da mutagênese desta lesão (HARACSKA et al., 2000; LIN et al., 2006; KAMIYA et al., 2010). A pol eta pode inserir A ou C em locais contendo 8-oxoG. O mau pareamento de 8-oxoG com A pode resultar em transversão de G>T (CARLSON et al., 2005). Como esta lesão não causa bloqueio da polimerase replicativa, a polimerase α pode replica-la incorporando C com menos eficiência do que incorpora G (SHIBUTANI et al., 1991). Como exposto anteriormente a 8-oxoG pode ser encontrada em células que foram expostas à luz UV, sobretudo UVA, deste modo, o fato de células de pacientes XP-V não possuírem a pol eta funcional também pode aumentar a susceptibilidade ao câncer de pele induzido por luz solar. Isso porque apesar de pol eta poder incorporar A frente a esta lesão, causando mutação, ela é dez vezes mais fiel que outras polimerases TLS e a sua ausência pode aumentar cerca de duas vezes a taxa de mutação nessas células (KAMIYA et al., 2010; MCCULLOCH et al., 2009).

Como as mutações estão envolvidas no desenvolvimento de carcinogênese, a hipermutabilidade dessas células pode explicar a predisposição genética dos pacientes XP-V ao câncer de pele em áreas expostas a luz solar (WANG et al., 1993; KANNOUCHE e STARY, 2003). Apesar do crescente interesse em entender como as mutações contribuem no alto índice de câncer de pele devido à luz UV em

pacientes XP-V, não se conhece o efeito direto da luz UVA em células XP-V, além disso, a contribuição da radiação UVA para a mutagênese solar e para o câncer de pele é ainda uma questão em debate.

1.5 Os efeitos da luz UVA em células de pacientes XP-V

Nas últimas décadas, com o aumento de aparecimento de tumores de pele devido à exposição a luz solar houve um aumento no interesse de entender como a luz UVA, que abrange cerca de 95% da luz UV que atinge a superfície da Terra, induz danos no DNA e mutagênese. Apesar do crescente aumento de trabalhos que relacionam os efeitos dos componentes da exposição à luz solar com efeitos deletérios, muitos mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados para UVA (SCHUCH et al., 2017).

Os mecanismos de indução de danos no DNA pela luz UVA vem sendo amplamente estudados, inclusive por nosso grupo de pesquisa. Dados da literatura indicam que UVA induz a formação direta de CPD (TYRRELL, 1973; DOUKI et al., PERDIZ et al., 2000; ROCHETTE et al., 2003; MORET et al., 2006; JIANG et al., 2009; RUNGER et al., 2012; CORTAT e GARCIA et al., 2013) e 6-4 PP (SCHUCH et al., 2009; CORTAT e GARCIA et al., 2013), bem como bases oxidadas na molécula de DNA (PEAK e PEAK, 1991; CADET et al., 2005; GIRARD et al., 2008; CORTAT e GARCIA et al., 2013; GUERANGER et al., 2014; YAGURA et al., 2017), mais especificamente a 8-oxoG (WAMER e WEI, 1997; ZHANG et al., 1997; COURDAVAULT et al., 2004). No entanto, a contribuição desses danos para os efeitos da luz UVA varia de acordo com o modelo utilizado e com as condições de irradiação e por esse motivo precisam ser melhor investigados. Por exemplo, utilizar meio de cultura durante a irradiação com UVA aumenta a contribuição do estresse oxidativo, uma vez que o meio de cultura possui fotossensibilizadores como as riboflavinas e podem induzir danos adicionais no DNA via reações de fotossensibilização (SAGE et al., 2012), fato que também observamos em nosso laboratório, e por isso as irradiações UVA (mesmo que longas) são feitas em células mantidas em solução salina (PBS) (CORTAT e GARCIA et al., 2013).

De modo geral, esses trabalhos que demonstraram a indução de danos no DNA por luz UVA relataram parada de ciclo celular e da progressão da replicação, morte celular e mutagênese em resposta a esses danos (EMONET-PICCARDI et al., 1998; MORLEY et al., 2003; RUNGER et al., 2012; GRAINDORGE et al., 2015).

Entretanto, esses resultados foram estabelecidos, principalmente, com a utilização de células normais e, em geral, indicam de que esses efeitos são menos efetivos dos que os observados para UVB e UVC, subestimando sua contribuição nos efeitos deletérios da luz solar. Além disso, esses trabalhos demonstram que os danos induzidos por UVA não induzem DDR (GIRARD et al., 20008) e atribuem a mutagênese induzida por UVA com a fraca indução desta resposta (RUNGER et al., 2012).

Outro aspecto muito importante que tem recebido atenção é a oxidação de proteínas em decorrência da exposição à luz UVA. Alguns autores, principalmente do grupo do Dr. Peter Karran, têm se dedicado a demonstrar que a luz UVA pode causar extensiva oxidação de proteínas, incluindo as proteínas que participam de NER, prejudicando o reparo das lesões. Eles reportaram que o estresse oxidativo gerado por UVA em queratinócitos humanos causou extensiva oxidação de proteínas, incluindo RPA, o que resultou em diminuição de reparo de CPDs e 6-4 PPs (GUVEN et al., 2015; GUERANGER et al., 2014; KARRAN e BREM, 2016). Se a luz UVA prejudica a capacidade das células de reparar os danos, isso poderia ser um fator extra para a sensibilidade e mutagênese de células humanas em geral, e sobretudo naquelas deficientes em TLS.

Como comentado acima, células XP-V apresentam aumento da frequência de mutações após exposição a luz UV. O que se conhece sobre a mutagenicidade de XP-V está relacionado à irradiação a UVC e UVB. Além de nenhum trabalho ter considerado a participação da luz UVA na mutagênese dessas células, todos os trabalhos realizados até o momento se limitaram a análises de alguns genes para inferir o padrão de mutagênese da luz UV, justificando deste modo, a necessidade de ensaios que observem padrões de mutagênese em escala genômica.

Os pacientes XP-V representam cerca de 20% do total de pacientes XP (BROUGHTON et al., 2002). No Brasil, na comunidade de Araras, Faina, GO, nosso grupo reportou uma frequência de 1:200 de pacientes XP-V, sendo descritas duas mutações diferentes (MUNFORD e CASTRO, 2017). Além disso, estamos verificando que a frequência de pacientes XP-V, em relação ao total de pacientes XP no país, pode ser maior do que o visto no restante do mundo (CASTRO et al, *in preparation*). Esses dados nos estimularam a estudar melhor os mecanismos pelos quais células XP-V respondem principalmente à luz UVA, na expectativa que nos permita entender melhor o fenótipo desses pacientes. Para isso empregamos

modelos com células XP-V e células controle (complementadas pelo gene *POLH* selvagem) que permitiram uma comparação entre células praticamente isotópicas. Além disso, realizamos estudos de mutagênese induzida por luz UVA em células XP-V, no qual desenvolvemos um sistema que envolveu clonagem celular e sequenciamento de nova geração (do inglês, *New Generation Sequencing* - NGS) de exomas. Esperamos que estes estudos possam também contribuir para esclarecer qual o impacto desses comprimentos de onda na formação de tumores em pacientes XP-V.

2. Objetivos da Tese

- ✓ Elucidar os efeitos citotóxicos e as respostas celulares de células normais e deficientes na DNA polimerase eta (XP-V) expostas a doses de luz UVA ambientalmente relevantes.
- ✓ Investigar o papel do estresse oxidativo nos efeitos deletérios da luz UVA.
- ✓ Avaliar o perfil mutagênico da luz UVA nesses dois modelos de fibroblastos humanos e correlacionar o padrão de mutação com os obtidos para câncer de pele.

CAPÍTULO V – Discussão geral e conclusões

Este trabalho foi realizado com o objetivo de elucidar a participação da luz UVA no fenótipo observado em pacientes com XP-V após a exposição a luz solar. Para isso investigamos principalmente os efeitos de irradiação UVA em células XP-V em relação a células controle. Foram abordados aspectos de sensibilidade celular e mecanismos celulares envolvidos em resposta à irradiação. Além disso, avaliamos a mutagênese induzida por luz UVA, uma vez que, do nosso conhecimento, nenhum trabalho da literatura contempla esses aspectos.

Nós verificamos que a exposição de células XP-V a uma dose ambientalmente relevante de luz UVA (120 kJ/m²) resultou em baixa sobrevivência celular e que, em células controle, a complementação dessas células com pol eta reduziu parte dessa sensibilidade. A alta porcentagem de morte celular da linhagem mutada em pol eta se deve muito provavelmente à sua incapacidade de replicar o DNA danificado, uma vez que a pol eta é uma das principais DNA polimerases de TLS, que faz o *bypass* das lesões induzidas por UV com grande eficiência. Com relação aos danos induzidos por luz UVA no DNA celular, nós detectamos alguns dos principais, CPDs, quebras e bases oxidadas. Nossos dados mostraram que, surpreendentemente, após irradiação com luz UVA, a remoção de CPDs foi prejudicada, apesar de serem proficientes em NER. De fato, ao investigarmos a capacidade reparo dessas linhagens, irradiadas com UVA, em reparar lesões no DNA de plasmídeos induzidas por luz UVC, confirmamos um forte comprometimento de NER principalmente em células XP-V. Nossos dados corroboraram com um trabalho prévio que demonstrou a diminuição da capacidade reparo de CPDs induzidos por UVA em queratinócitos humanos, associada a oxidação de proteínas de reparo (GUVEN et al., 2015). Essa redução na capacidade de NER pode ter uma implicação fenotípica importante, uma vez que o comprometimento de NER por UVA pode contribuir para o aumento da mutagênese em pacientes deficientes em TLS.

Indução de estresse genotóxico induzido por luz UVA foi avaliado através de anticorpo contra a fosforilação da histona H2AX por citometria de fluxo. Realizamos também ensaios de cometa alcalino, que permite detectar quebras simples fita do DNA ou sítios álcali sensíveis, e com a adição da glicosilase FPG, pudemos detectar bases oxidadas, reconhecidas pela enzima. Ambos ensaios mostraram que a luz UVA induz estresse genotóxico de forma mais pronunciada em células XP-V do que

em células proficientes em pol eta. Com a adição de FPG no ensaio cometa foi possível detectar sítios no DNA que sofreram ação do estresse oxidativo gerado pela irradiação com UVA nas duas linhagens utilizadas neste trabalho, porém células XP-V foram claramente mais susceptíveis a esses danos. Nós também comprovamos a indução de estresse oxidativo a nível de proteína, onde a detecção de proteínas carboniladas também se apresentou mais pronunciada em células XP-V. Esses resultados indicam que a diminuição do reparo das lesões pode ser explicada, em parte, pela oxidação de proteínas gerada pela exposição à luz UVA, como sugerido anteriormente (GUVEN et al., 2015; MONTANER et al., 2007). Esses trabalhos indicam que as proteínas RPA e PCNA, essenciais para o reparo do DNA e TLS, são alvo de oxidação decorrente da exposição a luz UVA são. Em células deficientes em TLS resultam a redução da capacidade de reparo também pode ser explicada pelo esgotamento de RPA, pelo aumento de regiões de DNA simples fita nas células em replicação, como verificado por outro grupo (TSAALBI-SHTYLIK et al., 2014).

Detectamos ainda que os danos induzidos pela luz UVA geraram bloqueio de elongação, com as forquilhas de replicação paradas, como observado por ensaios de fibra de DNA. As quebras verificadas em ensaios cometa também podem, ao menos em parte, ser devido a esse bloqueio. Células XP-V apresentaram comprometimento da elongação da forquilha de replicação (aumento significativo da relação CldU/IdU) comparado a célula complementada para pol eta. Como consequência desse bloqueio de síntese de DNA, nós observamos parada de ciclo celular em fase S, dados consistentes com a função de polimerase TLS de XPV. Como comentando acima, nossos resultados em conjunto e dados prévios da literatura indicaram que o estresse oxidativo poderia ser um fator atenuador de NER. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que o acúmulo de danos não reparados pode ser resultado de um processo de estresse replicativo intenso que poderia atenuar a ação de NER, como previamente observado para luz UVC (AUCLAIR et al., 2010).

Nós também demonstramos que parte das respostas aos danos no DNA induzidos por luz UVA, em células XP-V, é mediada pela via ATR/Chk1. A utilização do inibidor específico de ATR (VE-821) nos mostrou claramente a participação desta proteína em resposta aos danos induzidos por luz UVA, uma vez que a sua inibição resultou em extrema sensibilidade em células deficientes em pol eta. Além disso, a ativação de ATR foi comprovada através do aumento de fosforilação de seu alvo, a

proteína Chk1. Nossos dados vão contra a dados anteriormente descritos para células normais e ataxia telangiectasia mutada, no qual não se observou a indução de DDR após exposição à luz UVA (GIRARD et al., 2008) e trazem uma importante informação adicional a observação de que esta via pode ser ativada em células XP-V em resposta a UV em geral, e não só a UVB e UVC (DESPRAS et al., 2010; ANDRADE-LIMA et al., 2015).

Nós testamos a hipótese da participação do estresse oxidativo nos efeitos citotóxicos da UVA em células XP-V com o uso do antioxidante NAC. A eficiência do NAC como antioxidante foi demonstrada anteriormente em células normais e mutadas em ATM e em processos de recombinação homóloga, onde atenuou o comprometimento da forquilha de replicação e diminuição de quebras no DNA através da diminuição do estresse oxidativo gerado por UVA e peróxido de hidrogênio (EMONET-PICCARDI et al., 1998; MORLEY et al., 2003; GIRARD et al., 2008; GRAINDORGE et al., 2015; WILHELM et al., 2016). Neste contexto, nós verificamos uma melhora significativa na sobrevivência celular, diminuição da marcação de lesões CPD, provavelmente devido à melhora da capacidade de reparo, também observada. Além disso, houve uma diminuição da marcação γ H2AX, bem como redução na indução de quebras, de bases oxidadas (sítios sensíveis à FPG) e de carbonilação de proteínas. Corroborando com a diminuição da indução de danos, houve resgate da síntese de DNA, praticamente sem bloqueios na forquilha de replicação e também não houve parada de ciclo celular. Ainda, a diminuição da indução de danos refletiu em perda da sensibilidade pela inibição de ATR, assim como, diminuição da fosforilação de Chk1.

Através desses dados, nós fornecemos evidências notáveis de que o estresse oxidativo tem um papel crucial nos efeitos deletérios gerados pela luz UVA, principalmente em células deficientes em pol eta. Diferente do que está reportado na literatura para outras linhagens, nós demonstramos que em resposta aos danos induzidos por UVA e na ausência da pol eta, a via ATR/Chk1 é ativada. Além disso, nossos dados apontam o VE-821 como um poderoso sensibilizador de células XP-V que tiveram seu DNA danificado por UVA e o NAC como um importante antioxidante para prevenir os danos induzidos por UVA.

Outro objetivo extremamente importante deste trabalho foi identificar as mutações induzidas por luz UVA nessas células deficientes e proficientes em pol eta para tentar identificar a assinatura mutacional induzida por irradiação UVA, através

do desenvolvimento de uma tecnologia que permite identificação de mutações de ponto por sequenciamento de nova geração, de exomas. Além disso, pudemos confrontar nossos resultados com dados de sequenciamentos prévios de tumores de pele e verificar se ambos exibem perfis mutagênicos semelhantes.

Nossos resultados mostraram que a luz UVA induziu aumento de mutagênese em ambas as linhagens. No entanto, os clones deficientes em pol eta apresentaram frequência maior de mutações de ponto, comparado aos clones da linhagem complementada. Como já reportado para UVC e UVB (PROTIC-SABLJIC et al., 1986; DORADO et al., 1991; MCGREGOR et al., 1991; WANG et al., 1993; SAGE et al., 1996; STARY et al., 2003), embora com exceções, a luz UVA induziu principalmente em trocas C>T e CC>TT em células XP-V. Esses resultados foram claramente evidenciados pelas análises de mutação de ponto, e de sequências *motivo* que sugerem claramente a participação de dímeros de pirimidina (CPD) na origem dessas mutações, principalmente em células XP-V. Curiosamente, os dados apontam que células controle apresentam perfil mutagênico diferente, indicando que as mutações majoritárias (C>T) aparentemente podem ter origem diferente nas duas linhagens. Isso demonstra que a pol eta é capaz de replicar CPDs sem propensão a erros.

Diferente do observado em trabalhos anteriores para UVB e UVC, as análises de sequências *motivos* também apontaram a contribuição das bases oxidadas, principalmente 8-oxoG na origem de parte significativa das transversões C>A, induzidas por luz UVA em células XP-V. Esses dados suportam o papel importante da pol eta no *bypass* de bases oxidadas e no controle da mutagênese dessa lesão, como relatado acima e previamente reportado em experimentos *in vitro* ou em células com replicação específica dessa lesão (GROLLMAN e MORIYA, 1993; HARACSKA et al., 2000; CARLSON e WASHINGTON, 2005; MCCULLOCH et al., 2009; SILVERSTEIN et al., 2010; KAMIYA et al., 2010). Mais surpreendente foi a observação de diferença significativa na indução de frequência de mutações em células XP-V e controle mesmo quando não irradiadas. O tipo de mutação (C>A) e a assinatura das mutações encontradas nessas células sugerem sua origem devido a lesões promovidas por estresse oxidativo (8-oxoG), provavelmente endógenas, produtos do metabolismo celular. Esses dados levantam a possibilidade de que os pacientes XP-V teriam índices de mutação espontânea maior apenas pela

deficiência de pol eta, o que poderia explicar, pelo menos parcialmente eventuais tumores internos.

Nossos dados, em conjunto, demonstram que o estresse oxidativo apresenta, nas células XP-V, uma relação forte com os efeitos de sensibilidade e respostas a danos induzidos por luz UVA. Em mutagênese, os efeitos de estresse oxidativo também estão presentes, porém fotoprodutos do tipo CPD aparentemente apresentam uma relação causal mais evidente. Além disso, os dados mostram um forte indicativo da atenuação do reparo pela luz UVA e a importância de pol eta no *bypass* de lesões oxidadas tanto para os efeitos tóxicos quanto para o mutagênico.

Esperamos que esses dados possam auxiliar na compreensão dos fenótipos clínicos observados nos pacientes XP-V, e chamam a atenção para a necessidade desses pacientes evitarem também a exposição à luz UVA (que, por exemplo, não é bloqueada pelo vidro normal). Também acreditamos que os dados revelam efeitos da luz UVA em células humanas que eram desconhecidas, contribuindo para melhor entender como esta promove danos no genoma e as respostas celulares associadas. Concluindo, o perfil de mutações obtido para células XP-V se assemelha muito com o padrão de obtido nas análises de sequenciamentos de câncer de pele em geral. Seria fundamental também conhecer como são as mutações em tumores de pele em pacientes XP-V e entender a contribuição dessas lesões na transformação maligna, para confirmar a importância dos dados obtidos aqui.

Bibliografia Geral

AGAR, N. S. et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 4954–4959, 2004.

ANDRADE-LIMA, L. C.; ANDRADE, L. N.; MENCK, C. F. M. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. **Journal of cell science**, v. 128, p. 150–159, 2015.

BATISTA, L. F. Z.; KAINA, B.; MENEHINI, R.; MENCK, C. F. M. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. **Mutation Research**, v. 681, p. 197–208, 2009.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. ESTRESSE OXIDATIVO, LESÕES NO GENOMA E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DO CICLO CELULAR. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2006.

BESARATINIA, A. et al. Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 14, p. 5953–5958, 2007.

BRASH, D. E. et al. Photoproduct Frequency Is Not the Major Determinant of UV Base Substitution Hot-Spots or Cold Spots in Human-Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 3782–3786, 1987.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 297–308, 2008.

BROUGHTON, B. C.; CORDONNIER, A.; KLEIJER, W. J.; JASPERS, N. G. J.; FAWCETT, H.; RAAMS, A.; GARRITSEN, V. H.; SATRY, A.; AVRIL, M. F.; BOUDSOCQ, F.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; FUCHS, R. P.; SARASIN, A.; LEHMANN, A. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase in xeroderma pigmentosum-variant patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 99, p. 815, 2002.

BURREN, R. et al. Sunlight and carcinogenesis: Expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. **International Journal of Cancer**, v. 76, n. 2, p. 201–206, 1998.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. UVB and UVA radiation-mediated damage to isolated and cellular DNA. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, p. 947–961, 2005.

CARLSON, K. D.; WASHINGTON, M. T. Mechanism of efficient and accurate nucleotide incorporation opposite 7,8-dihydro-8-oxoguanine by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ . **Molecular and cellular biology**, v. 25, p. 2169–76, 2005.

CIMPRICH, K. A.; CORTEZ, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 616–27, 2008.

CLEAVER, J. E. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of Xeroderma Pigmentosum. **Journal of Dermatological Science**, v. 23, p. 1-11, 2000.

CLEAVER, J. E. Historical aspects of xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 637, p. 1-9, 2008.

CLEAVER, J. E. γ H2AX: Biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all the glitters is not gold". **Photochemical and Photobiological**, v. 87, p. 1230-1239, 2011a.

CLEAVER, J. E.; FEENEY, L.; REVET, I. Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. **Cell Cycle**, v. 10, p. 3223-3224, 2011b.

CHOI, J. H.; PFEIFER, G. P. The role of DNA polymerase η in UV mutational spectra. **DNA Repair**, v. 4, p. 211–220, 2005.

CORTAT, B.; GARCIA, C. C. M.; QUINET, A.; SCHUCH, A. P.; LIMA-BESSA, K. M.; MENCK, C. F. M. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 12, p. 1483-1495, 2013.

COSTA, R. M. A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, p. 1083-1099, 2003.

COURDAVAULT, S. et al. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, p. 135-142, 2004.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, p. 941-950, 2007.

DESPRAS, E.; DABOUSSI, F.; HYRIEN, O.; MARHEINEKE, K.; KANNOUCHE, P. L. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 1690–1701, 2010.

DIGIOVANNA, J. J.; KRAEMER, K. H. Shining a light on xeroderma pigmentosum. **The Journal of investigative dermatology**, v. 132, p. 785–96, 2012.

DORADO, G.; STEINGRIMSDOTTIR, H.; ARLETT, C. F.; LEHAMNN, A. R. Molecular analysis of ultraviolet-induced mutations in a xeroderma pigmentosum cell line. **Journal of Molecular Biology**, v. 217, p. 217–222, 1991.

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

DOUKI, T.; REYNAUD-ANGELIN, A.; CADET, J.; SAGE, E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry**, v. 42, p. 9221-

9226, 2003.

DOUKI, T. Relative contributions of UVB and UVA to the photoconversion of (6-4) photoproducts into their Dewar valence isomers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 92, p. 587-594, 2016.

DROBETSKY, E. A.; TURCOTTE, J.; CHÂTEAUNEUF, A. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2350–2354, 1995.

EL GHISSASSI, F. et al. A review of human carcinogens—Part D: radiation. **The Lancet Oncology**, v. 10, p. 751–752, 2009.

ELVERS, I.; HAGENKORT, A.; JOHANSSON, F.; DJUREINOVIC, T.; LAGERQVIST, A.; SCHULTZ, N.; STOIMENOV, I.; ERIXON, K.; HELLEDAY, T. CHK1 activity is required for continuous replication fork elongation but not stabilization of post-replicative gaps after UV irradiation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 8440–8448, 2012.

EMONET-PICCARDI, N. et al. Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. **Free Radical Research**, v. 29, p. 307–313, 1998.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 567, p. 1–61, 2004.

FRIEDBERG, E. C. SUFFERING IN SILENCE: THE TOLERANCE OF DNA DAMAGE. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 943-953, 2005.

FRIEDBERG, E. C.; MCDANIEL, L. D.; SCHULTZ, R. A. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, p. 5–10, 2004.

GIESE, B. Long-distance charge transport in DNA: The hopping mechanism. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, p. 631-636, 2000.

GHOSAL, G.; CHEN, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. **Translational Cancer Research**, v. 2, p. 107–129, 2013.

GIGLIA-MARI, G.; SARASIN, A. **TP53 mutations in human skin cancers Human Mutation**, v. 21, p. 217-228, 2003.

GIRARD, P. M.; POZZEBON, M.; DELACÔTE, F.; DOUKI, T.; SMIRNOVA, V.; SAGE, E. Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. **DNA Repair**, v. 7, p. 1500-1516, 2008.

GLICK, E. Mutations in human DNA polymerase eta motif II alter bypass of DNA lesions. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 7303–7312, 2001.

GRAINDORGE, D. et al. Singlet oxygen-mediated oxidation during UVA radiation alters the dynamic of genomic DNA replication. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1–26, 2015.

GRATCHEV, A.; STREIN, P.; UTIKAL, J.; GOERDT, S. Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant Clinical and genetic heterogeneity of Xeroderma pigmentosum and its variant. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 529–536, 2003.

GUERANGER, Q.; LI, F.; PEACOCK, M.; LARNICOL-FERY, A.; BREM, R.; MACPHERSON, P.; EGLY, J. M.; KARRAN, P. Protein Oxidation and DNA Repair Inhibition by 6-Thioguanine and UVA Radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 1408–1417, 2014.

GUVEN, M.; BARNOUIN, K.; SNIJDERS, A. P. L.; KARRAN, P. Oxidative Damage to RPA Limits the Nucleotide Excision Repair Capacity of Human Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 15, p. 4612–4623, 2016.

GREENMAN, C. et al. UKPMC Funders Group Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, p. 153–158, 2007.

GROLLMAN, A. P.; MORIYA, M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 216–219, 1993.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v. 281, p. 9–19, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in biology and medicine. **Oxford University Press Inc.**, New York, v. 4, p. 777, 2007.

HATTORI-NAKAKUKI, Y.; NISHIGORI, C.; OKAMOTO, K.; IMAMURA, S.; HIAI, H.; TOYOKUNI, S. Formation of 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in epidermis of hairless mice exposed to near-UV. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, p. 1132–1139, 1994.

HARACSKA, L. et al. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η . **Nature Genetics**, v. 25, p. 458–461, 2000.

HERMAN, K. N.; TOFFTON, S.; MCCULLOCH, S. D. Detrimental effects of UV-B radiation in a xeroderma pigmentosum-variant cell line. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, p. 375–384, 2014.

IKEHATA, H. et al. UVA induces C→T transitions at methyl-CpG-associated dipyrimidine sites in mouse skin epidermis more frequently than UVB. **Mutagenesis**, v. 18, p. 511–519, 2003.

IKEHATA, H.; ONO, T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v. 52, p. 115–125, 2011.

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

JONES, C. A.; HUBERMAN, E.; CUNNINGHAM, M. L.; PEAK, M. J. Mutagenesis and Cytotoxicity in Human Epithelial Cells by Far- and Near-Ultraviolet Radiations: Action Spectra¹. **Radiation Research**, v. 110, p. 244–254, 1987.

JONES, R. M.; PETERMANN, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. **The Biochemical Journal**, v. 443, p. 13–26, 2012.

JOHNSON, R. E. et al. Role of DNA Polymerase η in the Bypass of a (6-4) TT Photoproduct Role of DNA Polymerase in the Bypass of a (6-4) TT Photoproduct. **Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 1–7, 2001.

KAMIYA, H.; YAMAGUCHI, A.; SUZUKI, T.; HARASHIMA, H. Roles of specialized DNA polymerases in mutagenesis by 8-hydroxyguanine in human cells. **Mutation Research**, v. 686, p. 90–95, 2010.

KANAO, R. et al. UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase eta and/or iota. **DNA Repair**, v. 29, p. 139–146, 2015.

KANNOUCHE, P.; STARY, A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. **Biochimie**, v. 85, p. 1123–1132, 2003.

KAPPES, U. P. et al. Short-and Long-Wave UV Light (UVB and UVA) Induce Similar Mutations in Human Skin Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 667–675, 2006.

KARRAN, P.; BREM, R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. **DNA Repair**, v. 44, p. 178–185, 2016.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316–323, 2004.

KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light indicate (or are at least compatible with) a role of non-dimer. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 811–816, 1997.

KRAEMER, K. H.; PATRONAS, N. J.; SCHIFFMANN, R.; BROOKS, B. P.; TAMURA, D.; DIGIOVANNA, J. J. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype-phenotype relationship. **Neuroscience**, v. 145, p. 1388–1396, 2007.

KRANEN, H. J.; LAAT, A.; VEN, J.; WESTER, P. W.; VRIES, A.; BERG, R. J. W.; KREJIL, C. F.; GRUIJL, F. R. Low Incidence of p53 Mutations in UVA (365-nm)-induced Skin Tumors in Hairless Mice. **Cancer Research**, v. 57, p. 1238–1240, 1997.

LAAT, A.; VAN DER LEUN, J. C.; GRUIJL, F. R. Carcinogenesis induced by UVA (365 nm) radiation: the dose-time dependence of tumor promotion in hairless mice. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1013–1020, 1997.

LIMOLI, C. L.; GIEDZINSKI, E.; CLEAVER, J. Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. **Oncogene**, v. 24, p. 3708–3714, 2005.

LIN, Q.; CLARK, A. B.; MCCULLOCH, S. D.; YUAN, T.; BRONSON, R. T.; KINKEL, T. KUCHERLAPATI, R. Increased susceptibility to UV-induced skin carcinogenesis in polymerase eta-deficient mice. **Cancer research**, v. 66, p. 87–94, 2006.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D.; SCHULTZ, R. A.; ELLENBERGER, T. Disease states associated with defective biological responses to DNA damage. **DNA repair and mutagenesis**. 2 ed. Washington, D. C.: ASM Press, p. 1118, 2006.

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 18, p. 7644–7655, 1999.

LIN, Q.; CLARK, A. B.; MCCULLOCH, S. D.; YUAN, T.; BRONSON, R. T.; KUNKEL, T. A.; KUCHERLAPATI, R. Increased Susceptibility to UV-induced skin

carcinogenesis in polymerase η -deficient mice. **Cancer Research**, v. 1, p. 87-94, 2006.

LIU, S.; OPIYO, S.; MANTHEY, K.; GLANZER, J.; ASHLEY, A.; AMERIN, C.; TROKSA, K.; SHRIVASTAV, M. NICKLOFF, J.; OAKLEY, G. Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 10780–10794, 2012.

LO, H. L.; NAKAJIMA, S.; MA, L.; WALTER, B.; YASUI, A.; ETHELL, D. W.; OWEN, L. B. Differential biologic effects of CPD and 6-4 PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. **BMC Cancer**, v. 5, p. 135, 2005.

LOEB, L. A.; MONNAT, R. J. DNA polymerases and human disease. **Nature Reviews**, v. 9, p. 594-604, 2008.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. **Nature cell biology**, v. 13, p. 1161–1169, 2011.

MAH, L. J.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America**. v. 24, p. 679–686, 2010.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Perspectives in Biology**, v. 5, p. 1–17, 2013.

MASCIO, P.; MENCK, C. F. M.; NIGRO, R. G.; SARASIN, A. S. Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, p. 293-298, 1990.

MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; DOHMAE, N.; YOKOI, M.; YUASA, M.; ARAKI, M.; IWAI, S.; TAKIO, K.; HANAOKA, F. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. **EMBO Journal**, v. 399, p. 700-704, 1999.

MATSUNAGA, T.; HIEDA, K.; NIKAIDO, O. Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 3, p. 403–410, 1991.

CHIKAHIDE MASUTANI, RIKI KUSUMOTO, A. Y. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . **Letters to Nature**, v. 399, p. 700–704, 1999.

MCCULLOCH, S. D.; KOKOSKA, R. J.; GARG, P.; BURGERS, P. M.; KUNKEL, T. A. The efficiency and fidelity of 8-oxo-guanine bypass by DNA polymerases δ and η . **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 2830–2840, 2009.

MCGREGOR, W. G. et al. Cell cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells. **Molecular and cellular biology**, v. 11, p. 1927–1934, 1991.

MCGREGOR, W. G. et al. Abnormal, Error-Prone Bypass of Photoproducts by Xeroderma Pigmentosum Variant Cell Extracts Results in Extreme Strand Bias for

the Kinds of Mutations Induced by UV Light. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 147–154, 1999.

MCMILLAN, T. J.; LETHERMAN, RIDLEY, A.; SHORROCKS, J.; TOBI, S. E.; WHITESIDE, J. R. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 969–976, 2008.

MENCK, C. F. M.; ARMELINI, M. G.; LIMA-BESSA, K. M. On the Search for Skin Gene Therapy Strategies of Xeroderma Pigmentosum Disease. **Current Gene Therapy**, v. 7, p. 163–174, 2007.

MENCK, C. F. M.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 220–233, 2014.

MIYAJI, E. N. and MENCK, C. F. M. Photoreversion of ultraviolet induced apoptosis in rat kangaroo cells. **Apoptosis**, v. 1, p. 153-160, 1996.

MONTANER, B.; O'DONOVAN, P.; REELFS, O.; PERRETT, C. M.; ZHANG, X.; XU, Y.; REN, X.; MACPHERSON, P.; FRITH, D.; KARRAN, P. Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. **EMBO reports**, v. 8, p. 1074–1079, 2007.

MORLEY, N. et al. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 72, p. 55–60, 2003.

MOURET, S.; BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J.; DOUKI, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. **PNAS**, v. 103, p. 13765-13770, 2006.

MUNFORD, V.; CATRO, L. P.; SOUTO, R.; LERNER, L. K.; VILAR, J. B.; QUAYLE, C.; ASIF, H.; SCHUCH, A. P.; SOUZA, T. A.; IENNE, S.; ALVES, F. I. A.; MOURA, L. M. S.; GALANTE, P. A. F.; CAMARGO, A. A.; LIBOREDO, R.; PENA, S. D. J.; SARASIN, A.; CHAIBUB, S. C.; MENCK, C. F. M. A genetic cluster of xeroderma pigmentosum variant patients with two different founder mutations. **British Journal of Dermatology**, v. 176, p. 1270-1278, 2017.

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

OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO, D. T.; NIGRO, R. G.; MASCIIO, P.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced mutation spectrum in mammalian cells. **Nucleic Acids**, v. 25, p. 4319-4323, 1992.

PAGES, V. FUCHS, R. P. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene**, v. 21, p. 8957 – 8966, 2002.

PEAK, J. G.; PEAK, M. J. Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 246, p. 187-191, 1991.

PERDIZ, D.; GROF, P.; MEZZINA, M.; NIKAIDO, O.; MOUSTACCHI, E.; SAGE, E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells: Possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis.

Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 26732-26742, 2000.

PERSSON, A. E. et al. The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 18, p. 287–93, 2002.

PFEIFER, G. P.; YOU, Y. H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mutation Research**, v. 571, p. 19–31, 2005.

PLEASANCE, E. D. et al. UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature**, v. 463, p. 191–196, 2010.

PROTIC-SABLJIC, M.; TUTEJA, N.; MUNSON, P. J.; HAUSER, J.; KRAEMER, K. H.; DIXON, K. UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. **Molec.Cell.Biol.**, v. 6, p. 3349–3356, 1986.

QUINET, A.; VESSONI, A. T.; ROCHA, C. R. R.; GOTTIFREDI, V.; BIARD, D.; SARASIN, A.; MENCK, C. F. M.; STARY, A. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. **DNA Repair**, v. 14, p. 27–38, 2014.

RAVANAT, J.L.; DOUKI, T.; CAD, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 88–102, 2001.

RENET, I.; FEENEY, L.; BRUGUERA, S.; WILSON, W.; DONG, T. K.; OH, D. H.; DANKORT, D.; CLEAVER, J. E. Functional relevance of the histone γ H2Ax in the response to DNA damaging agents. **PNAS**, v. 108, p. 8663-8667, 2011.

ROBERT, C. et al. Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line. **J Invest Dermatol**, v. 106, p. 721–8, 1996.

ROCHETTE, P. J.; THERRIEN, J. P.; DROUIN, R.; PERDIZ, D.; BASTIEN, N.; DROBETSKY, E. A.; SAGE, E. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 2786-2794.

RUNGER, T. M.; KAPPES, U. P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 42, p. 2-10, 2008.

SAGE, E.; LAMOLET, B.; BRULAY, E.; MOUSTACCHI, E.; CHTEAUNEUF, A.; DROBETSKY, E. Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 176–180, 1996.

SAGE, E.; GIRARD, P. M.; FRANCESCONI, S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. Photochem. Photobiol. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 11, p. 74–80, 2012.

SALE, J. E.; LEHMANN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 141-152, 2012.

SCHÄRER, O. D. Chemistry and biology of DNA repair. **Mechanisms of DNA Repair**, v. 42, p. 2946–2974, 2003.

SCHUCH, A. P.; GALHARDO, R. S.; LIMA-BESSA, K. M.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 8, p. 111-120, 2009.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M.; GARCIA, C. C. M. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 110-124, 2017.

SETLOW, R. B.; GRIST, E.; THOMPSON, K.; WOODHEAD, A. D. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 6666–6670, 1993.

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, p. 431–434, 1991.

SPIVAK, G.; HANAWALT, P. C. Photosensitive human syndromes. **Mutation Research**, v. 776, p. 24-30, 2015.

STARESINCIC, L. et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 1111–1120, 2009.

STARY, A.; KANNOUCHE, P.; LEHMANN, A. R.; SARASIN, A. Role of DNA polymerase η in the UV-mutation spectrum in human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18767-18775, 2003.

STEENKEN, S.; JOVANOVIĆ, S. V. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 617–618, 1997.

TANIOKA, M.; MASAKI, T.; ONO, R.; NAGANO, T.; OTOSHI-HONDA, E.; MATSUMURA, Y.; TAKIGAWA, M.; INUI, H.; MIYACHI, Y.; MORIWAKI, S.; NISHIGORI, C. Molecular Analysis of DNA Polymerase Eta Gene in Japanese Patients Diagnosed as Xeroderma Pigmentosum Variant Type. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1745–1751, 2007.

TYRRELL, R. M. Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation, **Photochemical and Photobiological**, v. 17, p. 69–73, 1973.

TYRRELL, R. M.; KEYSE, S. M. New trends in photobiology the interaction of UVA radiation with cultured cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 4, p. 349-361, 1990.

VAN STEEG, H.; KRAEMER, K. H. Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. **Molecular Medicine Today**, v. 2, p. 86–94, 1999.

VAISMAN, A. et al. Sequence context-dependent replication of DNA templates containing UV-induced lesions by human DNA polymerase ι . **DNA Repair**, v. 2, n. 9, p. 991–1006, 2003.

VAISMAN, A. et al. DNA polymerase ι -dependent translesion replication of uracil

containing cyclobutane pyrimidine dimers. **DNA Repair**, v. 5, p. 210–218, 2006.

WAMER, W. G.; WEI, R. R. In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. **Photochemistry and photobiology**, v. 65, p. 560–563, 1997.

WANG, Y.; MAHER, V. M.; MITCHELL, D. L.; MCCORMICK, J. J. Evidence from Mutation Spectra that the UV Hypermutability of Xeroderma Pigmentosum Variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p. 4276–4283, 1993.

WANG, Y. C. et al. Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts. **Molecular and cellular biology**, v. 13, p. 4276–4283, 1993.

WANG, S. Q.; SETLOW, R.; BERWICK, M.; POLSKY, D.; MARGHOOB, A. A.; KOPF, A. W.; BART, R. S. Ultraviolet A and melanoma: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. 837–846, 2001.

WANG, Y.; WOODGATE, R.; MCMANUS, T. P.; MEAD, S.; MCCORMICK, J. J.; MAHER, V. M. Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase η , DNA polymerase I causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations. **Cancer Research**, v. 7, p. 3018–3026, 2007.

WATERS, L. S.; MINESINGER, B. K.; WILTROUT, M. E.; D'SOUZA, S. WOODRUFF, R. V.; WALKER, G. C. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 73, p. 134–154, 2009.

WIKONKAL, N. M.; BRASH, D. E. Ultraviolet Radiation Induced Signature Mutations in Photocarcinogenesis. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 4, p. 6–10, 1999.

WILHELM, T. et al. Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. **PLoS Genetics**, v. 12, p. 1–20, 2016.

YAGURA, T.; SCHUCH, A. P.; GARCIA, C. C. M.; ROCHA, C. R. R.; MORENO, N. C.; ANGELI, J. P. F.; MENDES, D.; SEVERINO, D.; SANCHEZ, A. B.; MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G.; MENCK, C. F. M. Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 86–93, 2017.

YANG, W. and WOODGATE, R. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 140, p. 15591–15598, 2007.

YOU, Y. H. et al. Cyclobutane Pyrimidine Dimers Are Responsible for the Vast Majority of Mutations Induced by UVB Irradiation in Mammalian Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 44688–44694, 2001.

YU, S. L. et al. Requirement of DNA polymerase η for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. **Molecular and cellular biology**, v. 21, p. 185–188, 2001.

YUASA, M.; MASUTANI, C.; EKI, T.; HANAOKA, F. Genomic structure,

chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant (XPV) gene. **Oncogene**, v. 19, p. 4721–4728, 2000.

ZHANG, XUESHU; ROSENSTEIN BARRY S., WANG; YAN, LEBWOHL, MARK; MITCHELL, DAVID M.; WEI, H. Induction of 8-oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine by Ultraviolet Radiation in Calf Thymus DNA and HeLa Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 119–124, 1997.

ZHANG, Y. et al. Response of human DNA polymerase iota to DNA lesions. **Nucleic acids research**, v. 29, p. 928–935, 2001.

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433–439, 2000.