CAROLINA MARIA BERRA

**ESTUDOS DE REPARO DE DNA POR EXCISÃO DE
NUCLEOTÍDEOS EM LESÕES OXIDATIVAS EM
CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciência.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico
Martins Menck

São Paulo

2008

RESUMO

BERRA, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. 2008. 134 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é bastante conhecido por reparar lesões causadas por luz ultravioleta (UV). Contudo, algumas evidências vêm mostrando também a sua provável atuação em reparo de lesões oxidativas. Mutações em alguns genes envolvidos em NER estão associadas a doenças genéticas raras clinicamente distintas cujos fenótipos não podem ser explicados simplesmente por deficiência em reparo de lesões UV, mas podem estar associados à deficiência em reparo de lesões oxidativas. No entanto, o mecanismo exato da atuação de NER nesse tipo de lesão ainda permanece bastante controverso. Com o objetivo de uma melhor compreensão do envolvimento do NER em lesões oxidativas foi averiguado os efeitos da foto-excitação do azul de metileno (MB) em DNA plasmidial bem como em células deficientes em NER. Sabe-se que a foto-excitação do MB *in vitro* gera principalmente lesões do tipo 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) em DNA. Assim, DNA plasmidial foi tratado com MB e luz visível e, em seguida, digeridos com a enzima formamidopirimidina(fapi)-DNA glicosilase (FPG) para verificar a presença de sítios sensíveis à esta por eletroforese em gel de agarose. Os resultados mostraram que o DNA plasmidial apresentou mais sítios sensíveis a FPG quando o MB foi foto-excitado, confirmando que MB e luz podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de danificar o DNA. Foi verificado que fibroblastos humanos imortalizados com SV40 proficientes ou deficientes no mecanismo de NER (XP-A e XP-C) puderam incorporar MB de forma semelhante e, dentro das células, o MB pôde gerar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Foi verificado por imunocitoquímica, que a foto-excitação de diferentes concentrações de MB formou também 8-oxoG em núcleos de fibroblastos. Além disso, foi averiguado por ensaios clonogênicos e por citometria de fluxo, que as células deficientes nos genes *XPA* e *XPC* foram mais sensíveis a foto-excitação do MB do que as células proficientes em NER. Também foi averiguado, por ensaio cometa, que as células deficientes em NER apresentaram mais danos oxidativos em seu DNA genômico do que as células selvagens após tratamento com MB e luz. Contudo, todas as células testadas apresentaram a mesma cinética de reparo das lesões geradas após o tratamento. Além disso, houve mais marcação de γ -H2AX em células mutantes no gene *XPA* e *XPC* após a foto-excitação do MB, sugerindo maior susceptibilidade dessas linhagens às quebras da molécula de DNA quando comparadas às células proficientes em NER. Desta forma, os resultados sugerem que a excitação por luz visível do MB gera danos oxidativos e quebras na molécula de DNA, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que as proteínas *XPA* e *XPC* podem ter algum papel na proteção desse estresse, além da sua sabida participação em reparo de lesões induzidas por luz UV.

Palavras-chave: Reparo de DNA. Lesões oxidativas. Fotossensibilização.

ABSTRACT

BERRA, C. M. The involvement of nucleotide excision repair in DNA oxidative lesions in mammals cells. 2008. 134 f. PhD Thesis (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Pulo, São Paulo, 2008.

Nucleotide excision repair (NER) mechanism is well known to be involved in the removal of UV-induced lesions. However, the participation of this repair mechanism in oxidative DNA lesions is still controversial. Few data indicate that NER-deficient cells have problems to recognize and remove oxidized guanines, suggesting the involvement of this pathway in oxidative lesion repair. In order to study the participation of NER mechanisms in the removal of oxidative DNA lesions, we examined the effects of photoactivated methylene blue (MB) directly in plasmidial DNA as well as in NER-deficient cells. MB photoactivation is known to produce mainly 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoG) damage after *in vitro* DNA treatment. To confirm these data, plasmid DNA was treated *in vitro* with MB and light and then analyzed by electrophoresis for the presence of sites cleaved by FPG, a glycosylase that recognizes and cleaves DNA at certain damaged bases, including 8-oxoG. The results show that the plasmid DNA presents more FPG sensitive sites when MB was photoactivated than non-photoactivated, confirming that MB and light can produce oxygen free radicals (ROS) that can damage DNA. *In vivo* assays using wild type human fibroblast cultured cells or NER-deficient (XP-A and XP-C) showed that MB can be similarly incorporated in all cells tested. Moreover, the photoactivation is able to generate singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) inside cells. We also detected the presence of 8-oxoG in genomic DNA of cells treated with MB and light by immunohistochemistry using an antibody anti-8-oxoG. We performed an *in vivo* assay treating cells with MB and light to verify the induction of oxidative lesion in genomic DNA. Data show that XP-A and XP-C deficient cells are more sensitive to photoactivated MB-induced damage than wild type cells by clonogenic survival assay and flow cytometry. In addition, using alkaline comet assay, XP-A and XP-C cells were found to have more oxidative DNA lesions after MB and light treatment than wild type cells. However, there is a clear similarity in repair kinetic between proficient and deficient cells line, but there are more $\gamma\text{-H2AX foci}$ in XP-A and XP-C cells after MB photoactivation suggesting more susceptibility of DNA strand breaks of these cells lines when compared to NER-proficient cells. Therefore, these results suggest that photoactivated MB generates oxidative damage and DNA strand breaks both *in vitro* and *in vivo* assays and that XPA and XPC proteins may also have a role in the protection of cellular oxidative stress, in addition to its participation in repair of UV-induced DNA damage.

Key words: DNA repair. Oxidative lesions. Photo excitation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agentes capazes de danificar a molécula de DNA

O DNA é uma complexa molécula orgânica responsável pelas informações genéticas das células dos organismos. Para que essas informações sejam transmitidas com sucesso de geração para geração, a integridade do DNA deve ser mantida. Contudo, apesar de sua considerável estabilidade química, estudos sobre o seu metabolismo mostraram a dinamicidade da molécula (FRIEDBERG, 2003) e que a exposição constante a diversos agentes podem produzir uma variedade bastante grande de lesões na sua estrutura (Figura 1). Essas lesões podem afetar mecanismos celulares essenciais como a replicação do DNA e sua transcrição em RNA. Como consequência, danos no DNA podem produzir na célula efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxico (morte celular), dependendo da natureza dessas lesões e, conseqüentemente, instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (DE BOER *et al.*, 2000).

Durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas na sua estrutura que comprometam o seu bom funcionamento, como por exemplo, desemparelhamento de bases. Outro exemplo é a perda do grupo amino presente em três das quatro bases do DNA (citosina, adenina e guanina). Essa perda ocorre espontaneamente em reações dependentes do pH e da temperatura, caso estes se encontrem alterados (HOEIJMAKERS, 2001). Alguns dos produtos decorrentes da desaminação podem resultar em alteração de bases no DNA e que, durante a sua replicação, geram mutações definitivas. Apesar das mutações serem essenciais quando se pensa em processos evolutivos, são antes de tudo deletérias aos sistemas biológicos. Podem ocorrer, ainda, perda das bases do DNA, especialmente em pHs ácidos gerando sítios abásicos (APs) (apurínico / apirimidínico) (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Figura 1: Esquema ilustrativo de agentes comuns que podem danificar o DNA e exemplos de lesões no DNA induzidas por esses agentes. Abreviações: *cis*-Pt e MMC, cisplatina e mitomicina-C, respectivamente (ambos agentes de ligações cruzadas com DNA); 6-4(PP) e CPD, 6-4 fotoprodutos e dímeros de pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). Adaptada de (HOEIJMAKERS, 2001).

Além de alterações espontâneas, modificações induzidas por inúmeros agentes químicos e físicos, provenientes do próprio metabolismo celular ou do ambiente em que os organismos vivem, também podem atuar de maneira significativa na desorganização da estrutura da molécula de DNA.

Alguns agentes químicos que podem causar danos ao DNA são os agentes alquilantes, muitos dos quais são utilizados como quimioterápicos no tratamento de muitos tumores (KAINA *et al.*, 2007). Esses compostos químicos possuem alta afinidade com moléculas orgânicas e muitos já foram comprovados por serem carcinogênicos. Além disso, intermediários do próprio metabolismo normal da célula, como por exemplo, S-adenosyl-metionina, também demonstraram ter capacidade de alquilar o DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

A radiação ionizante (IR) é uma das maiores fontes naturais de agentes físicos que pode causar danos em todos os componentes celulares dos organismos e, no DNA, induzir uma enorme variedade de lesões, como quebra da simples fita (SSBs) (*"Single Strand Breaks"*), quebra da dupla fita (DSBs) (*"Double Strand Breaks"*), ligações cruzadas entre proteína-DNA e várias modificações das bases (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Historicamente, contudo, os estudos dos mecanismos de reparo de lesões no DNA surgiram a partir das investigações de danos gerados por radiação ultravioleta (UV), devido à facilidade em reproduzir e medir esse tipo de sistema (CALLEGARI *et al.*, 2007). Além disso, a luz UV é de grande relevância biológica, uma vez que, desde o começo da evolução da vida no planeta, a maioria dos organismos convive com os efeitos genotóxicos gerados pela luz solar (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Isso ocorre porque as bases do DNA são capazes de absorver diretamente os fótons provenientes de comprimentos de ondas curtas (RAVANAT *et al.*, 2001). Quando o DNA é exposto à luz UV-C (200 a 280 nm) ou UV-B (280 a 320 nm), pirimidinas adjacentes podem se ligar covalentemente gerando, principalmente, dímeros de pirimidina cis-sin-ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs), lesões que causam distorção na dupla hélice do DNA (YOU *et al.*, 2001; SCHUL *et al.*, 2002). A formação de lesões oxidativas nas bases do DNA após exposição à luz UV-B também já foi relatada, mas em uma proporção muito menor do que a dos dímeros de pirimidina (RAVANAT *et al.*, 2001). A absorção de fótons no comprimento de onda da luz UV-A (320 a 400 nm) pelo DNA é muito baixa, mas pode excitar cromóforos endógenos e causar lesões de forma indireta, via geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (*"Reactive Oxygen Species"*) (RAVANAT *et al.*, 2001). No entanto, alguns autores mostraram que CPDs também podem ser formados nesse comprimento de onda (DOUKI *et al.*, 2003).

Dentro das células também podem ser produzidas substâncias lesivas originadas como consequência do próprio metabolismo celular. Uma parte do oxigênio (O₂) consumido pelas células aeróbicas pode gerar ROS, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem reagir com várias moléculas intracelulares (HALLIWELL *et al.*, 1999). ROS são também produzidas durante processos patológicos, como, por exemplo, o que ocorre numa resposta inflamatória celular. Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores como: o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons

metálicos associados a essa biomolécula (EVANS *et al.*, 2004). No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos das células via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA e lesões nessa molécula, se não reparadas, podem levar a sérias consequências celulares.

1.2 Geração de ROS dentro das células

É importante salientar que ROS nem sempre são consequência do metabolismo celular, mas podem ser também geradas pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular (BARZILAI *et al.*, 2004). Em geral, deve-se notar que a geração intracelular de ROS, considerada normal em níveis fisiológicos, quando não é necessariamente lesiva, tem um importante papel vital, uma vez que essas espécies, nesses casos produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI *et al.*, 2004).

ROS é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio, que são aquelas espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (HALLIWELL *et al.*, 1999) exemplificados na Tabela 1.

As espécies moderadamente reativas como $\text{O}_2\cdot^-$ e H_2O_2 , quando em contato com alguns componentes celulares, como o íon ferro (Fe^{2+}), por exemplo, geram $\cdot\text{OH}$, um produto bastante reativo (MARTINEZ, 2003). Essas ROS podem atacar o DNA e produzir danos oxidativos em suas bases, ou até causar quebra da molécula. Além disso, o $\text{O}_2\cdot^-$, juntamente com os radicais livres e o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$ - gerado fisiologicamente na célula) reagem para formar o peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente citotóxico (HEMNANI *et al.*, 1998). Mais ainda, os radicais livres podem oxidar moléculas de lipídeos e proteínas gerando intermediários reativos que reagem com o DNA e formam adutos com essa molécula (MARNETT, 2000).

Tabela 1: Exemplos de geração e desativação enzimática de ROS

Geração de ROS*Geração de radical superóxido* *Geração de radical hidroxila - Reação de Fenton* *Geração de oxigênio singlete por fotossensibilização Tipo II* **Proteção contra ROS***Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)* *Glutathione Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)* *Glutathione Redutase (GRd – fora do peroxissoma)* *Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)*

Abreviações: S, fotossensibilizador no estado fundamental; ^3S , fotossensibilizador no estado triplete excitado; $^3\text{O}_2$, estado triplete do oxigênio. Adaptada de (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; BERRA *et al.*, 2006).

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem:

- (i) Enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GRd), glutathione peroxidase (GPx) e catalases (CAT) (Tabela 1);

- (ii) Proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais quais íons ferro e íons cobre, como por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas;
- (iii) Proteínas que protegem processos celulares contra os danos oxidativos através de outros mecanismos não enzimáticos, como por exemplo, as proteínas de estresse (“stress proteins”);
- (iv) Moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar ROS via auto-oxidação, como por exemplo, glutatona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno.

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando a geração de ROS excede a capacidade antioxidante celular, pode haver a formação de uma condição conhecida como “estresse oxidativo”, cujos resultados podem ser bastante danosos às células. Essa condição pode variar bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada.

1.3 Oxigênio singlete

O estado mais estável da molécula diatômica do oxigênio ($^3\Sigma_g^-O_2$) possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado num orbital degenerado distinto, o que confere a sua característica como um agente oxidante, uma vez que pode capturar elétrons de outra molécula (Figura 2). No entanto, esses dois elétrons capturados devem ser de spin antiparalelo para poderem se ajustar aos espaços vazios nos orbitais degenerados. Um par de elétrons num orbital atômico ou molecular não obedeceria este critério, uma vez que de acordo com o princípio de Pauli's, possuem spins opostos (HALLIWELL *et al.*, 1999). Isso impõe uma restrição na transferência de elétrons e tende a fazer com que o oxigênio aceite esses elétrons um de cada vez, o que contribui para explicar porque o oxigênio reage lentamente com muitos compostos não radicalares.

A forma mais reativa do oxigênio conhecida como 1O_2 pode ser gerada por uma transferência de energia (mais detalhes a seguir). Existem dois estados de 1O_2 , um estado

mais reativo ($^1\Sigma_g^+O_2$) e outro menor reativo ($^1\Delta_gO_2$), sendo que este último não tem um elétron livre e, por definição, não é um radical (Figura 2). O estado $^1\Sigma_g^+$ do oxigênio rapidamente decai ao estado $^1\Delta_g$, assim, somente esta última forma é normalmente considerada nos sistemas biológicos e é muito mais oxidativa do que o oxigênio, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no último orbital e não há a restrição de spin. O 1O_2 em solução pode se desativar por transferir a sua energia excitada ao solvente, assim a sua meia vida depende do solvente em que foi gerado (HALLIWELL *et al.*, 1999).

Figura 2: Esquema simplificado das ligações da forma diatômica da molécula de oxigênio e seus derivados. Adaptada de (HALLIWELL *et al.*, 1999).

1.4 Geração de oxigênio singlete via fotossensibilização

Biologicamente, a fotossensibilização é o processo no qual uma molécula, denominada fotossensibilizador, absorve luz visível ou luz UV e subsequentemente produz espécies reativas que alteram moléculas intracelulares (KOCHEVAR *et al.*, 1996). O processo de fotossensibilização ocorre quando um sensibilizador, luz de comprimento de onda apropriado e oxigênio estão presentes simultaneamente (KOCHEVAR *et al.*, 2000).

Fotossensibilizadores são moléculas que possuem a capacidade de absorver luz numa determinada região espectral e transferir essa energia para outras moléculas por transferência de elétrons (redução ou oxidação) (OLIVEIRA, 2006). Primeiramente, ocorre a excitação eletrônica do fotossensibilizador pela energia luminosa o que o leva ao estado excitado singlete ($^1\text{sens}^*$) (Figura 3). Na maioria dos casos, o fotossensibilizador é levado ao estado excitado tripleto ($^3\text{sens}^*$) por um processo conhecido como cruzamento intersistemas (ISC) e, esse estado, tem uma duração maior que o $^1\text{sens}^*$. Desta forma, os fotossensibilizadores mais eficientes são aqueles que possuem um estado $^3\text{sens}^*$ de longa duração e alto rendimento quântico (MARTINEZ, 2003).

Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos do tipo I e do tipo II. Abreviaturas: $h\nu$: radiação incidente; sens : fotossensibilizador no estado fundamental; $^1\text{sens}^*$: fotossensibilizador no estado singlete excitado; $^3\text{sens}^*$: fotossensibilizador no estado tripleto excitado; $\text{sens}^{\bullet-}$: radical ânion do fotossensibilizador; $\text{sens}^{\bullet+}$: radical cátion do fotossensibilizador; R : reagente; $\text{R}^{\bullet-}$: radical ânion do substrato orgânico; $\text{R}^{\bullet+}$: radical cátion do substrato orgânico; ISC: cruzamento intersistemas. Adaptado de (MARTINEZ, 2003; BERRA *et al.*, 2006).

Existem dois destinos possíveis para o $^3\text{sens}^*$. No mecanismo tipo I há transferência de elétrons entre o $^3\text{sens}^*$ e componentes do sistema (Figura 3). Este processo gera íons radicais que podem reagir com oxigênio resultando em produtos oxidados (MARTINEZ, 2003). No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia do $^3\text{sens}^*$ para o oxigênio, gerando $^1\text{O}_2$ (Figura 3). Esses mecanismos fotoquímicos podem ocorrer simultaneamente e a importância relativa de cada processo depende da molécula alvo, da eficiência da

transferência de energia do sensibilizador ao oxigênio e da concentração de oxigênio (HALLIWELL *et al.*, 1999).

Os fotossensibilizadores mais comuns usados em laboratório para a geração de $^1\text{O}_2$ incluem laranja de acridina, azul de metileno, rosa Bengala e azul de tolueno, mas muitos compostos biológicos também são eficientes no uso *in vitro*, como a vitamina riboflavina e seus derivados (HALLIWELL *et al.*, 1999). O $^1\text{O}_2$ gerado pela foto-excitação dessas substâncias pode tanto atacar os próprios fotossensibilizadores como reagir com qualquer outra molécula presente no sistema.

As reações de fotossensibilização que envolvem $^1\text{O}_2$ são importantes em muitas situações biológicas como, por exemplo, em cloroplastos que contêm clorofilas e uma alta concentração de O_2 , ou ainda, nas células da retina que contêm retinal que pode gerar $^1\text{O}_2$ quando expostas a luz intensa e danificar os lipídeos presentes em volta da retina. Além disso, muitas doenças podem levar a geração excessiva de $^1\text{O}_2$ como ocorre, por exemplo, em porfirias, doenças causadas por um problema na biossíntese do grupo heme, o que provoca um acúmulo de porfirinas na pele dos indivíduos e que, quando expostos à luz, podem desenvolver problemas cutâneos sérios como erupções, cicatrizes e espessamentos (HALLIWELL *et al.*, 1999).

Por outro lado, as aplicações terapêuticas da citotoxicidade das reações de fotossensibilização têm sido bastante usadas por causa do aperfeiçoamento de fotossensibilizadores e pelo desenvolvimento de sistemas de incidência de luz (KOCHEVAR *et al.*, 1996), como por exemplo no tratamento de icterícia geralmente desenvolvida por bebês recém nascidos. A cor amarelada é causada pelo acúmulo do pigmento bilirrubina na pele. Em bebês, a quantidade insuficiente da enzima glucoronil transferase presente no fígado faz com que essa bilirrubina lipossolúvel se acumule no sangue e se deposite em tecidos com alto teor de lipídeos como, por exemplo, o cérebro, onde isso pode causar danos irreversíveis. A icterícia pode ser tratada pela exposição dos bebês à luz azul, o que provoca a quebra do pigmento pela reação de fotossensibilização tipo II (HALLIWELL *et al.*, 1999).

Outro exemplo da utilização terapêutica das reações de fotossensibilização é a Terapia Fotodinâmica, muito utilizada no tratamento de alguns tipos de tumores, já que é bem pouco invasiva e com poucos efeitos colaterais quando comparada com a quimioterapia e a radioterapia (OLIVEIRA, 2006). Na Terapia Fotodinâmica normalmente se utiliza um

fotossensibilizador administrado sistematicamente ou topicamente e o tecido é então irradiado. Para que ocorra o efeito fototóxico é necessária a presença de um fotossensibilizador, luz e oxigênio dissolvido. Para tumores em situação de hipóxia, utiliza-se a Terapia Fotoquímica, que requer fotossensibilizadores específicos que atuem na ausência de oxigênio. As aplicações da Terapia Fotodinâmica são ampliadas para além das aplicações com tumores, quando também são utilizadas no tratamento de diversas doenças virais e microbianas (WAINWRIGHT, 2003).

1.5 Fotossensibilizador azul de metileno (MB)

O azul de metileno (MB) (*"Methylene Blue"*), é um fotossensibilizador que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos (Figura 4). O MB tem carga positiva (MB^+), é hidrofílico e isso determina muitos aspectos da sua farmacologia e da sua localização intracelular, o que possibilita também a sua ampla utilização em Terapias Fotodinâmicas (WAINWRIGHT *et al.*, 1997). A cor azul característica desse corante é por causa da sua forte absorção de luz entre os comprimentos de onda de 550-700 nm (TUIE *et al.*, 1993). Dependendo das condições do meio e da sua concentração, o MB pode formar agregados e isso determina diversas características fotofísicas e fotoquímicas do composto (OLIVEIRA, 2006).

Figura 4: Estrutura química da molécula de MB. Os números referem-se à posição dos carbonos. Adaptada de (ROHS *et al.*, 2000).

Foi verificado que a dimerização do composto provoca diminuição no rendimento quântico de fluorescência e favorece reações de transferência de elétrons (OLIVEIRA, 2006). Quando o MB está na sua forma dimerizada a fotólise promove formação dos radicais semi-reduzido ($\text{MB}^\bullet$) e semi-oxidado ($\text{MB}^{2+\bullet}$) (Figura 5), favorecendo, portanto, o mecanismo tipo I. Por outro lado, quando o MB está na sua forma monomerizada, há transferência de energia do MB no seu estado triplete (^3MB) para o oxigênio molecular gerando $^1\text{O}_2$, seguindo assim, o mecanismo tipo II (OLIVEIRA, 2006). Dessa forma, o MB pode atuar tanto pelo mecanismo tipo I ou tipo II, dependendo do seu estado de agregação.

Figura 5: Rotas de reação do MB. Abreviações: MB^+ , azul de metileno no estado fundamental; $^1\text{MB}^{+*}$, azul de metileno no estado singlete; $^3\text{MB}^{+*}$, azul de metileno no estado triplete; $\text{MB}^\bullet$, radical semi-reduzido do azul de metileno; $\text{MB}^{2+\bullet}$, radical semi-oxidado do azul de metileno; Ω_1 , absorção luminosa; ϕ_f , rendimento quântico de fluorescência; ϕ_{nr} , rendimento quântico de decaimento não radioativo; ϕ_T , rendimento quântico de formação de triplete. Adaptada de (OLIVEIRA, 2006).

Em meios biológicos, o MB pode sofrer reação de redução após excitação eletrônica, gerando radical semi-reduzido ($\text{MB}^\bullet$) e leuco-MB (Figura 5). Após a transferência de elétrons há a formação de radical MB e, posteriormente, um próton e mais um elétron são sequencialmente transferidos, gerando leuco-MB (OLIVEIRA, 2006). Alguns doadores de elétrons, como por exemplo, NAD(P)H ou ascorbato, podem reduzir MB^+ para sua forma

leuco-MB, o qual, sob autooxidação gera H_2O_2 ou $\text{O}_2^{\bullet-}$. Estes podem danificar diretamente substratos biológicos ou ainda na presença de ferro (Fe^{3+}) podem ser convertidos em $\bullet\text{OH}$ via reação de Fenton (TUIE *et al.*, 1993). Assim, considerando possíveis espécies reativas nas reações de fotossensibilização, a participação de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\bullet\text{OH}$ devem ser consideradas juntamente com $^1\text{O}_2$.

1.6 Danos oxidativos no DNA

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com ROS. Essa reação pode levar a formação de bases oxidadas devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos pelas ROS ou, ainda, podem levar à formação de quebras na molécula de DNA. Essas quebras podem ocorrer em apenas uma das cadeias do DNA formando as SSBs ou, ainda, serem formadas em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA formando, assim, as DSBs. Além disso, SSB podem gerar DBS durante a replicação celular.

Mais de 20 diferentes tipos de danos nas bases do DNA foram identificados após a exposição dessa biomolécula às diversas formas de estresses oxidativos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). A guanina, que exibe o menor potencial de ionização entre as bases nitrogenadas, tem sido a escolha preferencial dos estudos das reações de oxidação das purinas, uma vez que existem metodologias eficientes para a sua detecção (COLLINS *et al.*, 2004). Desta forma, a guanina vem sendo utilizada como um bom exemplo de oxidação de bases nitrogenadas.

Em concentrações fisiológicas H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ não causam danos significativos na molécula de DNA. Por outro lado, o $\bullet\text{OH}$ gera uma multiplicidade de danos, uma vez que pode atacar purinas, pirimidinas e açúcar. O $\bullet\text{OH}$ é bastante estudado na geração de reações radiculares com a guanina presente tanto no “pool” de nucleosídeos (2'-deoxiguanosina, dG) formando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), quanto na sua forma nucleotídica formando 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) (CADET *et al.*, 2003). Por exemplo, $\bullet\text{OH}$ pode atacar as posições 4, 5 ou 8 do anel purínico da guanina (Figura 6), sendo que a adição de OH na posição C-8 produz o radical C-8 OH-aduto que, por sua vez, pode ser reduzido a 8-oxoG,

oxidado a 8-hidroxiguanina ou sofrer abertura do anel imidazol seguido da redução por um elétron e protonação para gerar 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (Fapy-G) (Figura 7) (HALLIWELL *et al.*, 1999).

Figura 6: Reação do $\cdot\text{OH}$ com guanina. Adaptado de (EVANS *et al.*, 2004).

Figura 7: Formação de produtos a partir do radical C8-OH-aduto da guanina na ausência de oxigênio. Adaptado de (EVANS *et al.*, 2004).

Enquanto $\cdot\text{OH}$ não possui nenhuma seletividade no ataque aos componentes da molécula de DNA, o $^1\text{O}_2$ por sua vez, é muito mais seletivo e produz predominantemente 8-oxoG (FLOYD *et al.*, 1989; SIES *et al.*, 1992; CADET *et al.*, 2000; RAVANAT *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2003) (Figura 8).

Figura 8: Formação de produtos a partir da guanina na presença de $^1\text{O}_2$.

Dados na literatura mostram que MB pode intercalar na molécula de DNA (ROHS *et al.*, 2000). A meia vida do MB no estado triplete, além de ser maior que a meia vida do MB no estado singlete, é aumentada quando este está ligado à molécula de DNA (TUIE *et al.*, 1993). A intercalação do MB na molécula de DNA sugere que muitos danos podem ser formados diretamente nas suas bases após a foto-excitação desse composto. SIMON *et al.*, (1962) foram os primeiros a demonstrarem que a fotossensibilização do MB leva a uma destruição preferencial da base guanina em DNA dupla fita. Em seguida, outros autores mostram que o MB excitado por luz visível produz principalmente 8-oxoG na dupla fita de DNA (FLOYD *et al.*, 1989; SCHNEIDER *et al.*, 1990; BOITEUX *et al.*, 1992; JAISWAL *et al.*, 1998; ELLIOTT *et al.*, 2000). Interessantemente, outros trabalhos mostraram que, em DNA dupla fita, a via que leva a formação de 8-oxodG é predominante na presença de $^1\text{O}_2$ (FLOYD *et al.*,

1989; CADET *et al.*, 2000; RAVANAT *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2003), sugerindo que esta espécie reativa é a principal via de oxidação do DNA na presença do fotossensibilizador MB.

1.7 Mecanismos de reparo de DNA

Os mecanismos de reparo de DNA são processos fundamentais na proteção das células contra danos, assegurando a transmissão fiel das informações genéticas de geração para geração. Algumas respostas celulares são realmente acompanhadas do reparo bioquímico de danos no DNA. Contudo, existem respostas que não incluem a remoção das lesões, mas que toleram a existência delas e, assim, são chamadas de mecanismos de tolerância às lesões. Estes mecanismos podem resultar em mutação permanente no genoma. Biologicamente, a habilidade das células em tolerar os danos é tão importante quanto à habilidade em repará-los (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Várias estratégias de reparo de DNA pela remoção de lesões presentes nessa molécula foram selecionadas nos organismos durante a evolução (DE LAAT *et al.*, 1999). Basicamente existem duas formas fundamentais de reparo de lesões geradas no material genético celular: 1) envolve a reversão direta do dano no DNA; 2) envolve a excisão completa dessa lesão.

1.7.1 Reversão direta da lesão

A princípio, a reversão direta de lesões no DNA é o mecanismo mais simples pelo qual o DNA pode ser reparado. O mecanismo bioquímico é baseado em apenas uma reação a qual uma única enzima específica reconhece e reverte a lesão. A fotorreativação é um bom exemplo de reversão direta de lesões no DNA induzidas por irradiação UV, que produz tanto CPDs como 6-4 PPs. A fotorreativação é realizada por um grande número de enzimas dependentes de luz, chamadas de fotoliasas (FRIEDBERG *et al.*, 2006), cujos homólogos são encontrados em vários procariontes e eucariontes. Dois tipos diferentes de fotoliasas foram

descobertas, uma para cada tipo de lesão: CPD fotoliase e 6-4 fotoliase. Apesar dos diferentes substratos, o mecanismo envolvido para realizar a reversão da lesão é bastante similar (VONARX *et al.*, 1998; SANCAR, 2000).

Outro tipo de reversão direta ocorre em danos causados pela ligação de grupos alquilas às bases do DNA. As proteínas que fazem essa reversão são chamadas de alquiltransferases (EISEN *et al.*, 1999). Em bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), foram descritos três mecanismos distintos para o reparo de danos alquilantes. No primeiro, as proteínas ALK-A e TAG retiram purinas alquiladas, como 3-metiladenina e 7-metilguanina do DNA. No segundo, ADA e OGT revertem diretamente danos, como O⁶-metilguanina, por uma reação irreversível onde o grupo metila é transferido para resíduos de cisteínas na própria proteína, num processo suicida. No terceiro, a proteína ALK-B, recentemente descrita como sendo uma desmetilase oxidativa, reverte lesões do tipo 1-metiladenina e 3-metilcitosina catalisando a oxidação do grupo metila e, assim, regenerando a base lesada (FALNES, 2004).

Esses processos de reversão direta de lesões no DNA, embora eficientes, são bastante limitados devido à alta especificidade entre enzima e substrato. Desta forma, foram selecionadas, durante a evolução, outras estratégias mais generalizadas para a remoção das lesões cujas bases danificadas são retiradas e substituídas por novos nucleotídeos. Esse tipo de resposta celular aos danos no DNA é chamado de reparo por excisão. Existem vários mecanismos que atuam de maneiras distintas na remoção das lesões através do processo de reparo por excisão. A seguir são descritos alguns desses mecanismos.

1.7.2 Reparo por emparelhamento errôneo

O reparo por emparelhamento errôneo de DNA (MMR) (“*Mismatch Repair*”) corrige par errôneo de bases e alças no DNA eventualmente introduzidas por erros de replicação. Também está envolvido em meiose e recombinação (BUERMEYER *et al.*, 1999) e, em humanos, a deficiência em MMR está associada a câncer hereditário. *E. coli* tem sido usada como modelo para o estudo desse mecanismo de reparo e, neste organismo, quatro proteínas importantes estão envolvidas: MUT-S, MUT-H, MUT-L e MUT-U, cada uma

presente em um passo do processo. Homólogos a esses genes têm sido encontrados em outros organismos, incluindo eucariotos, o que demonstra a importância evolutiva de MMR (EISEN *et al.*, 1999).

1.7.3 Reparo por recombinação

Outro tipo de reparo por excisão é o reparo por recombinação. Uma das lesões que pode ser reparada por esse mecanismo é a dupla quebra da cadeia de DNA criada por vários processos normais da célula, ou por agentes exógenos como a irradiação ionizante. Existem dois caminhos envolvidos no reparo desse tipo de lesão: recombinação homóloga (HR) ("*Homologous Recombination*"), que assegura um reparo bastante preciso; e junção de pontas não homólogas (NHEJ) ("*Non-Homologous End-Joining*"), sujeito a erro (KOBAYASHI *et al.*, 2008). Ambos os processos são regulados por muitos passos. Resumidamente, o primeiro passo é o reconhecimento das lesões por proteínas sensoras, sendo que as maiores candidatas são ATM ou o complexo protéico RAD50/MRE11/NBS1. Em seguida, as proteínas mediadoras recebem a informação da alteração estrutural gerada pelas proteínas sensoras e esse sinal é amplificado pelas proteínas transdutoras. Por fim, as proteínas efetoras executam as reações enzimáticas necessárias para o processamento do DNA, re-ligação das pontas livres e regulação do ciclo celular.

1.7.4 Reparo por excisão de bases

O reparo por excisão de bases (BER) ("*Base Excision Repair*") é responsável pela remoção de uma grande variedade de lesões, como bases desaminadas, alquiladas, oxidadas ou ausentes. O passo inicial do BER consiste no reconhecimento e excisão de bases danificadas pelas glicosilases. Cada glicosilase é específica para um número limitado de bases modificadas. Pelo menos doze DNA glicosilases diferentes já foram identificadas em humanos (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). As glicosilases podem ser monofuncionais e remover

somente a base modificada deixando um sítio AP ou podem ser bifuncionais as quais possuem, além da sua atividade de glicosilase, a atividade liase.

O mecanismo molecular do BER inicia-se, primeiramente, pelo reconhecimento e excisão de bases danificadas pelas DNA glicosilases sem ou com atividade 3'-AP liase associada (LINDAHL *et al.*, 1999) (Figura 9). A excisão da base resulta num sítio AP sem ou com incisão 3', que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases, que fazem a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio AP, gerando uma lacuna. Esta é preenchida através de polimerização e ligação de novos nucleotídeos à sequência de DNA (SLUPPHAUG *et al.*, 2003).

Após a remoção da base, o reparo pode ser completado por duas vias: a via curta ("*Short-Patch Repair*") que remove apenas um nucleotídeo, ou a via longa ("*Long-Patch Repair*") que remove de 2-8 nucleotídeos (Figura 9). A escolha de uma das vias é geralmente determinada pela natureza da DNA glicosilase e do sítio AP resultante, mas também pode depender do momento do ciclo celular e da localização sub-nuclear do processo. Assim, a via longa requer uma série de fatores que também estão envolvidos em replicação, como a DNA pol δ ou ϵ (aparentemente estimuladas pela pol β), FEN1, PCNA, DNA ligase 1 e muito provavelmente RPA. Por sua vez, a via curta não quer PCNA ou FEN1 e utiliza pol β e DNA ligase III estimulada pela XRCC1 (SLUPPHAUG *et al.*, 2003).

Uma das lesões oxidativas mais estáveis e mutagênicas, a 8-oxoG, pode parear tanto com a citosina como com a adenina, quase que com a mesma frequência, resultando em uma transversão GC para TA (DAVID *et al.*, 2007). Além disso, a incorporação de 8-oxodGTP gerado pela oxidação de dGTP também leva a ambas as transversões AT para CG e CG para AT (TAJIRI *et al.*, 1995).

A remoção de 8-oxoG foi primeiramente descrita em bactérias *E. coli*, onde o produto do gene *FPG* (ou *MUTM*) remove a base modificada que está pareada com uma citosina, enquanto que a proteína *MUTY* retira a adenina inserida erroneamente em frente a 8-oxoG (BOITEUX *et al.*, 1992; MICHAELS *et al.*, 1992). Outra proteína bacteriana, a *MUT-T*, elimina 8-oxodGTP do "pool" de nucleotídeos precursores de DNA através da hidrólise de 8-oxodGTP em 8-oxodGMP, que depois é excretado da célula (MAKI *et al.*, 1992; HAYAKAWA *et al.*, 1995). Homólogos em mamíferos têm sido identificados, mas em humanos o gene *OGG1*,

que codifica uma glicosilase/AP liase funcionalmente equivalente a enzima FPG, parece ser a única enzima capaz de reparar 8-oxoG do DNA a partir do mecanismo de BER (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; DAVID *et al.*, 2007).

Figura 9: Vias alternativas de BER. A e B: Via curta iniciada pela glicosilase bifuncional hOGG1 ou pela monofuncional UNG, respectivamente. Sítios AP não modificados são reparados pela via curta motivado pela pol β e depois é feita a ligação do novo nucleotídeo, seguindo o passo de ligação. C: Os sítios AP reduzidos ou oxidados são processados via PCNA e envolve a retirada de 2-8 nucleotídeos pela FEN1. As proteínas catalíticas estão sublinhadas. Adaptada de (SLUPPHAUG *et al.*, 2003).

1.7.5 Reparo por excisão de nucleotídeos

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (*"Nucleotide Excision Repair"*) é um dos mais importantes processos no reparo de lesões no DNA e tem sido intensivamente estudado. Este mecanismo apresenta uma enorme versatilidade e universalidade em reparar lesões que causam distorção na dupla-hélice do DNA geradas, principalmente, por agentes exógenos (DE LAAT *et al.*, 1999; PETIT *et al.*, 1999; DE BOER *et al.*, 2000). Por exemplo, os mais relevantes alvos do NER são CPDs e 6-4 PP, as duas classes de lesões mais freqüentes induzidas por luz UV (DE LAAT *et al.*, 1999; DE BOER *et al.*, 2000).

O princípio bioquímico geral do reparo por excisão de nucleotídeos é bastante conservado desde bactérias até humanos (EISEN *et al.*, 1999) tendo sido estudado, primeiramente, em *E. coli* e, posteriormente, utilizado como modelo para o estudo desse processo em outros organismos. Contudo, as proteínas envolvidas neste mecanismo não dividem homologia entre procariontes e eucariontes e muitos passos no sistema destes últimos são mais complexos (SANCAR, 1996; DE LAAT *et al.*, 1999; PETIT *et al.*, 1999).

O processo do NER em eucariontes envolve a ação de aproximadamente 30 proteínas que atuam em cinco passos sucessivos: 1) reconhecimento da lesão; 2) abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; 3) dupla incisão nas extremidades dessa lesão; 4) síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e 5) ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à seqüência original (DE BOER *et al.*, 2000).

O NER possui atividade heterogênea em regiões distintas do genoma, sendo mais rápido na fita transcrita de um gene ativo. Esse processo, dependente da ação da RNA polimerase II (RNAPol II), denomina-se reparo acoplado à transcrição (TCR) (*"Transcription Coupled Repair"*) e assegura um rápido reparo dos genes ativos, sendo que o reparo do genoma global (GGR) (*"Global Genome Repair"*), independente da RNAPol II, é capaz de remover lesões localizadas em qualquer parte do genoma celular (BOHR *et al.*, 1985; MELLON *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 2003). A figura 10 representa esquematicamente essas duas sub-vias do mecanismo de NER em humanos.

Figura 10: Modelo molecular geral do mecanismo de NER em humanos. Lesões contidas no genoma global ou na fita não transcrita são removidas pelo GGR, enquanto lesões contidas na fita transcrita de um gene ativo são reparadas pelo TCR. Após o reconhecimento da lesão, ocorre abertura da dupla hélice do DNA, a região da lesão é removida e, finalmente, há a síntese de reparo. Adaptada de (HOEIJMAKERS, 2001).

O que diferencia essas duas sub-vias do NER é o passo do reconhecimento da lesão. No TCR sugere-se que a RNAPol II é bloqueada frente a lesão e este é o passo principal para o direcionamento das proteínas de reparo para a fita transcrita (DONAHUE *et al.*, 1994). Esse mecanismo assegura um rápido reparo dos genes ativos e permite que as células retomem a transcrição e a síntese protéica mesmo que ainda existam lesões em cerca de 90% do genoma total (HANAWALT *et al.*, 1994; STARY *et al.*, 2002). Duas proteínas são necessárias para este passo inicial: CSA e CSB. A proteína CSA possui cinco repetições WD-40 importantes para a interação proteína-proteína (HENNING *et al.*, 1995). A CSB é uma proteína pertencente à família SWI/SNF DNA-dependente de ATPase envolvida em remodelamento da cromatina (TROELSTRA *et al.*, 1992). Sabe-se também que ela pertence ao complexo de alongação da RNAPol II (VAN GOOL *et al.*, 1997). Contudo, as funções exatas dessas duas proteínas nesse processo ainda permanecem obscuras. Acredita-se que as proteínas CSA e CSB permitam o acesso à lesão por induzirem a retração ou a dissociação da RNAPol II bloqueada na lesão e, em seguida, recrutem as outras proteínas do NER (TROELSTRA *et al.*, 1992; HANAWALT *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2003).

No GGR, o primeiro passo consiste no reconhecimento da lesão através da ligação do complexo XPC-hHR23B (SUGASAWA *et al.*, 1998) ao DNA contendo alguma distorção (SUGASAWA *et al.*, 2001; SUGASAWA *et al.*, 2002; MAILLARD *et al.*, 2007). Neste passo inicial, outro complexo protéico, XPE-DDB2, também é importante no reconhecimento da lesão. Este parece ter muita afinidade por certos tipos de lesões, facilitando o reconhecimento de lesões que são fracamente reconhecidas pelo complexo XPC-hHR23B (COSTA *et al.*, 2003).

Após o reconhecimento das lesões outros componentes do NER são recrutados: XPA, RPA, TFIIH e XPG formando, assim, o complexo pré-incisão. XPA é uma proteína que possui grande afinidade por lesões no DNA induzidas pela luz UV. Em geral, acredita-se que a sua afinidade está relacionada ao tamanho da distorção que a lesão gera na estrutura do DNA (COSTA *et al.*, 2003). RPA tem grande afinidade por DNA simples fita e liga-se a fita oposta a lesão. XPA juntamente com RPA são as responsáveis por estabilizar todo o complexo, uma vez que possuem grande afinidade ao DNA (SHUCK *et al.*, 2008). O TFIIH (fator de transcrição da RNAPol II) é um complexo protéico constituído por nove subunidades e, inicialmente, foi identificado como um fator de iniciação de transcrição basal dirigida pela RNAPol II (GERARD

et al., 1991; FRIT *et al.*, 1999; MAILLARD *et al.*, 2008). Algumas de suas proteínas, XPD e XPB possuem atividade helicase, sendo assim, esse complexo também é requerido para a abertura da dupla hélice de DNA ao redor da lesão (SHUCK *et al.*, 2008).

O terceiro passo é feito pela dupla incisão ao redor da lesão. Este processo requer as atividades endonucleases de XPG a 3' da lesão e do complexo ERCC1-XPF a 5' da lesão (O'DONOVAN *et al.*, 1994; SIJBERS *et al.*, 1996). XPG não é necessária apenas para a incisão, mas também para a formação do complexo pré-incisão, indicando o seu papel estrutural nesse complexo (DE LAAT *et al.*, 1999). Após a incisão segue-se a excisão da pequena região do DNA que contém a lesão.

O quarto passo é marcado pela síntese do novo DNA, utilizando como molde a fita não danificada. Estudos *in vitro* sugerem uma eficiente síntese de DNA após a adição dos fatores de replicação RPA, RFC, PCNA e DNA polimerase δ e ϵ (SHIVJI *et al.*, 1995). O último passo do processo é a ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à sequência original. Um forte candidato desta reação é a DNA ligase I (DE LAAT *et al.*, 1999; PETIT *et al.*, 1999; DE BOER *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2003).

1.8 NER e lesões oxidativas no DNA

Problemas genéticos que perturbam os mecanismos de reparo estão quase que invariavelmente associados a síndromes severas (SHILOH, 2003), como por exemplo, Síndrome de Cockayne (CS) e xeroderma pigmentosum (XP), síndromes autossômicas raras que estão associada a alterações no mecanismo de NER (DE BOER *et al.*, 2000). Pouco se sabe, contudo, sobre a relação entre doenças genéticas e mutações em glicosilases envolvidas em BER. Recentemente foi descrito o primeiro trabalho que relaciona alteração na glicosilase MUTY com câncer do intestino (AL-TASSAN *et al.*, 2002; DAVID *et al.*, 2007).

Fenotipicamente os pacientes CS apresentam sensibilidade à luz e problemas de desenvolvimento cerebral associado com envelhecimento precoce, retardo mental e degeneração generalizada dos órgãos. Na maioria dos casos os pacientes apresentam mutações nos genes CSA e CSB, sendo que 80% dos casos estão associados a mutações neste

último gene (TUO *et al.*, 2003). Sabe-se que as células desses pacientes são deficientes no NER-TCR de lesões induzidas por luz UV (COOPER *et al.*, 1997).

No caso dos pacientes XP, eles apresentam extrema sensibilidade à luz solar, resultando em uma pigmentação anormal, aumento de até mil vezes na incidência de tumores em regiões expostas da pele e envelhecimento precoce (DE BOER *et al.*, 2000; EGLY, 2001; COSTA *et al.*, 2003). Além disso, esses pacientes podem apresentar uma redução da expectativa de vida de 30-40 anos (MORIWAKI *et al.*, 2001). Cerca de 30 % dos pacientes XP apresentam também problemas neurológicos, como retardo mental, funções motoras anormais e degeneração neurológica progressiva (KRAEMER *et al.*, 2007). Existe uma relação bastante complexa entre as características clínicas dos pacientes XP e os problemas moleculares em NER. Esses pacientes apresentam alguma mutação em um dos sete genes envolvidos em NER-GGR (XPA a XPG) (KRAEMER *et al.*, 2007). Uma vez que o mecanismo funciona em passos seqüenciais, um problema em alguma dessas etapas prejudica a função das etapas subseqüentes. A causa das alterações neurológicas desses pacientes ainda permanece desconhecida.

Os sintomas clínicos bastante variados dos pacientes dessas síndromes sugerem que outros processos, além da remoção de lesões do tipo CPDs e 6-4PPs, estejam afetados, uma vez que os neurônios não estão expostos à luz UV. Uma possível explicação para os problemas neurológicos encontrados nos pacientes XP e CS é a existência de danos oxidativos que promovem alterações na estrutura do DNA e, assim, também devem ser substrato das proteínas envolvidas em NER (KRAEMER *et al.*, 2007), implicando, deste modo, em uma relação entre NER e lesões oxidativas. Desta forma, sugere-se que o acúmulo progressivo de lesões oxidativas poderia levar ao fenótipo de neurodegeneração descrito em alguns casos de pacientes XP e CS.

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que NER-TCR poderia estar envolvido no reparo de algumas lesões oxidativas como timina glicol (Tg) e 8-oxoG geradas por irradiação ionizante ou induzidas por ROS (LE PAGE *et al.*, 2000). Contudo, esses dados foram contestados pela comunidade científica e ainda há muita discussão em relação ao bloqueio de transcrição por lesões oxidativas e, conseqüentemente, sobre o envolvimento de NER-TCR no reparo dessas lesões (GOWEN *et al.*, 2003; CHECK, 2005; LE PAGE *et al.*, 2005).

Atualmente, muitos pesquisadores propõem a existência de interação entre os diferentes componentes dos mecanismos de reparo de DNA. Neste caso, mais até do que

um envolvimento direto de NER em lesões oxidativas, supõe-se que exista uma regulação de BER via alguns componentes de NER. De fato, muitos dados recentes indicam interações entre proteínas de BER e NER. Por exemplo, existem evidências de que XPG estimula *in vitro* a atividade da NTH1 humana, uma glicosilase que remove pirimidinas oxidadas pelo processo de BER (BESSHO, 1999; KLUNGLAND *et al.*, 1999). Outro exemplo é a interação e estímulo das proteínas HR23A e HR23B com a proteína 3-metiladenina-DNA glicosilase, também uma integrante do BER (MIAO *et al.*, 2000). Em células de mamíferos a glicosilase OGG1, funcionalmente análoga a FPG de *E. coli* é a principal via de reparo de lesões 8-oxoG (BOITEUX *et al.*, 2000), sendo que STEVNSNER *et al.*, (2002) observaram que CSB pode regular a expressão de OGG1. Curiosamente, SHIMIZU *et al.*, (2003) descreveram a interação física e funcional da proteína XPC com a timina-DNA glicosilase, uma proteína de BER envolvida no reparo de bases desemparelhadas. Recentemente, D'ERRICO *et al.*, (2006) mostraram que XPC também estimula a atividade da OGG1, sendo que a presença de XPC acelera a remoção de 8-oxoG em células humanas. Estes fatos sugerem a existência de mecanismos paralelos de remoção de lesões oxidativas via interação entre os mecanismos de reparo.

Além disso, baseado nas observações de que muitos componentes de NER podem atuar em BER, é fácil de acreditar que a regulação do NER pode ser, pelo menos em parte, controlado por mediadores do estresse oxidativo. Muitos genes que codificam proteínas do NER têm seqüência de ligação na sua região promotora que podem ser reconhecidos por fatores de transcrição sensíveis ao estado redox da célula. Por exemplo, a expressão de ERCC1, que funciona como uma 5'-endonuclease de NER (em complexo com XPF), pode ser mediada pelo fator de transcrição AP-1 mediante estresse oxidativo (LI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999). Além disso, LANGIE *et al.*, (2007) verificaram que a exposição de células epiteliais de carcinoma pulmonar humanas (A549) expostas a doses não-tóxicas de H₂O₂ mostraram aumento da expressão dos genes *XPA*, *XPC*, *XPF* e *XPG*, mas a expressão de *ERCC1* foi reduzida, sugerindo que a capacidade de NER, bem como a expressão dos genes relacionados a esse mecanismo, podem ser moduladas por estresse oxidativo.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados e analisados neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ Foi possível padronizar uma metodologia eficaz para a indução de lesões oxidativas, tanto *in vitro* como em células em cultura, utilizando-se como agente indutor o MB excitado por luz visível.
- ✓ A concentração do MB e o tempo de iluminação são fatores determinantes para a geração dos danos no DNA.
- ✓ Em testes *in vitro*, utilizando-se plasmídeos de DNA dupla fita, foi possível detectar a formação de, principalmente, bases oxidadas e muito pouca formação de quebras da molécula de DNA, de modo similar entre DHPNO₂ e MB excitado por luz, provavelmente devido ao mesmo intermediário ¹O₂.
- ✓ A incorporação do MB é semelhante em todas as linhagens celulares analisadas.
- ✓ Foi possível detectar a geração intracelular de ¹O₂, em todas as linhagens analisadas.
- ✓ As células mutantes em NER (XP-A e XP-C) são sensíveis ao estresse oxidativo gerado pela excitação luminosa do MB.
- ✓ Foi possível detectar a formação de bases oxidadas nas células analisadas, após a foto-excitação do MB, sendo que todas apresentaram os mesmos níveis desses danos.
- ✓ Foi possível detectar mais quebras na molécula de DNA nas células XP-A e XP-C do que nas células selvagens após a foto-excitação do MB.
- ✓ As células deficientes e proficientes em NER apresentaram a mesma dinâmica de reparo, tanto de bases oxidadas quanto de quebras da molécula de DNA.
- ✓ As proteínas de NER (XPA e XPC) estão direta ou indiretamente relacionadas à proteção celular ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TASSAN, N.; CHMIEL, N.H.; MAYNARD, J.; FLEMING, N.; LIVINGSTON, A.L.; WILLIAMS, G.T.; HODGES, A.K.; DAVIES, D.R.; DAVID, S.S.; SAMPSON, J.R.; CHEADLE, J.P. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. Nat. Genet., v.30, n.2, p.227-32, 2002.
- ANDERSON, S.M.; KRINSKY, N.I. Protective action of carotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes. Photochem. Photobiol., v.18, n.5, p.403-8, 1973.
- ANDERSON, S.M.; KRINSKY, N.I.; STONE, M.J.; CLAGETT, D.C. Effect of singlet oxygen quenchers on oxidative damage to liposomes initiated by photosensitization or by radiofrequency discharge. Photochem. Photobiol., v.20, n.1, p.65-9, 1974.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair, Amsterdam, v.3, n.8-9, p.1109-15, 2004.
- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.; DI MASCI, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. Quim. Nova, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.
- BESSHO, T. Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. Nucleic Acids Res., v.27, n.4, p.979-83, 1999.
- BLAZEK, E.R.; PEAK, J.G.; PEAK, M.J. Singlet oxygen induces frank strand breaks as well as alkali- and piperidine-labile sites in supercoiled plasmid DNA. Photochem. Photobiol., v.49, n.5, p.607-13, 1989.
- BOHR, V.A.; SMITH, C.A.; OKUMOTO, D.S.; HANAWALT, P.C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell, v.40, n.2, p.359-69, 1985.
- BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. Biochemistry, v.31, n.1, p.106-10, 1992.
- BOITEUX, S.; O'CONNOR, T.R.; LAVAL, J. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. Embo. J., v.6, n.10, p.3177-83, 1987.
- BOITEUX, S.; RADICELLA, J.P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. Arch. Biochem. Biophys., v.377, n.1, p.1-8, 2000.
- BUERMEYER, A.B.; DESCHENES, S.M.; BAKER, S.M.; LISKAY, R.M. Mammalian DNA mismatch repair. Annu. Rev. Genet., v.33, p.533-64, 1999.
- BUNTING, J.R. A test of the singlet oxygen mechanism of cationic dye photosensitization of mitochondrial damage. Photochem. Photobiol., v.55, n.1, p.81-7, 1992.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res.*, v.627, n.1, p.31-5, 2007.
* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, v.531, n.1-2, p.5-23, 2003.

CADET, J.; DOUKI, T.; POUGET, J.P.; RAVANAT, J.L. Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement. *Methods Enzymol.*, v.319, p.143-53, 2000.

CALLEGARI, A.J.; KELLY, T.J. Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle*, v.6, n.6, p.660-6, 2007.

CANETE, M.; VILLANUEVA, A.; JUARRANZ, A. Uptake and photoeffectiveness of two thiazines in HeLa cells. *Anticancer Drug Des.*, v.8, n.6, p.471-7, 1993.

CHECK, E. Retracted papers damage work on DNA repair. *Nature*, v.435, n.7045, p.1015, 2005.

COLLINS, A.R.; CADET, J.; MOLLER, L.; POULSEN, H.E.; VINA, J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.*, v.423, n.1, p.57-65, 2004.

COLLINS, A.R.; DUTHIE, S.J.; DOBSON, V.L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, v.14, n.9, p.1733-5, 1993.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVAO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, v.23, n.3, p.143-51, 2008.

COOPER, P.K.; NOUSPIKEL, T.; CLARKSON, S.G.; LEADON, S.A. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science*, v.275, n.5302, p.990-3, 1997.

COSTA, R.M.; CHIGANCAS, V.; GALHARDO RDA, S.; CARVALHO, H.; MENCK, C.F. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.*, v.85, n.11, p.1083-99, 2003.

D'ERRICO, M.; PARLANTI, E.; TESON, M.; DE JESUS, B.M.; DEGAN, P.; CALCAGNILE, A.; JARUGA, P.; BJORAS, M.; CRESCENZI, M.; PEDRINI, A.M.; EGLY, J.M.; ZAMBRUNO, G.; STEFANINI, M.; DIZDAROGLU, M.; DOGLIOTTI, E. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo. J.*, v.25, n.18, p.4305-15, 2006.

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

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, v.21, n.3, p.453-60, 2000.

DE LAAT, W.L.; JASPERS, N.G.; HOEIJMAKERS, J.H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, v.13, n.7, p.768-85, 1999.

DESPRAS, E.; PFEIFFER, P.; SALLES, B.; CALSOU, P.; KUHFITIG-KULLE, S.; ANGULO, J.F.; BIARD, D.S. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. Cancer Res., v.67, n.6, p.2526-34, 2007.

DI MASCI, P.; MENCK, C.F.; NIGRO, R.G.; SARASIN, A.; SIES, H. Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector. Photochem. Photobiol., v.51, n.3, p.293-8, 1990.

DONAHUE, B.A.; YIN, S.; TAYLOR, J.S.; REINES, D.; HANAWALT, P.C. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.91, n.18, p.8502-6, 1994.

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, n.30, p.9221-6, 2003.

DUSINSKA, M.; DZUPINKOVA, Z.; WSOLOVA, L.; HARRINGTON, V.; COLLINS, A.R. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. Mutagenesis, v.21, n.3, p.205-11, 2006.

EGLY, J.M. The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. FEBS Lett., v.498, n.2-3, p.124-8, 2001.

EISEN, J.A.; HANAWALT, P.C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. Mutat. Res., v.435, n.3, p.171-213, 1999.

ELLIOTT, R.M.; ASTLEY, S.B.; SOUTON, S.; ARCHER, D.B. Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage. Free Radic. Biol. Med., v.28, n.9, p.1438-46, 2000.

EMMERT, S.; KOBAYASHI, N.; KHAN, S.G.; KRAEMER, K.H. The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.97, n.5, p.2151-6, 2000.

EPE, B.; MUTZEL, P.; ADAM, W. DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. Chem. Biol. Interact., v.67, n.1-2, p.149-65, 1988.

EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat. Res., v.567, n.1, p.1-61, 2004.

FALNES, P.O. Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins. Nucleic Acids. Res., v.32, n.21, p.6260-7, 2004.

FENG, Z.; HU, W.; TANG, M.S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.101, n.23, p.8598-602, 2004.

FERNANDEZ-CAPETILLO, O.; LEE, A.; NUSSENZWEIG, M.; NUSSENZWEIG, A. H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair, Amsterdam, v.3, n.8-9, p.959-67, 2004.

FLOYD, R.A.; WEST, M.S.; ENEFF, K.L.; SCHNEIDER, J.E. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. Arch. Biochem. Biophys., v.273, n.1, p.106-11, 1989.

FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. Nature, v.421, n.6921, p.436-40, 2003.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press. 2006.

FRIT, P.; BERGMANN, E.; EGLY, J.M. Transcription factor IIH: a key player in the cellular response to DNA damage. Biochimie, v.81, n.1-2, p.27-38, 1999.

GERARD, M.; FISCHER, L.; MONCOLLIN, V.; CHIPOULET, J.M.; CHAMBON, P.; EGLY, J.M. Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. J. Biol. Chem., v.266, n.31, p.20940-5, 1991.

GOWEN, L.C.; AVRUTSKAYA, A.V.; LATOUR, A.M.; KOLLER, B.H.; LEADON, S.A. Retraction. Science, v.300, n.5626, p.1657, 2003.

GUTTER, B.; NISHIOKA, Y.; SPECK, W.T.; ROSENKRANZ, H.S.; LUBIT, B.; ERLANGER, B.F. Immunofluorescence for the detection of photochemical lesions in intracellular DNA. Exp. Cell. Res., v.102, n.2, p.413-6, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press Inc. 1999.

HANAHAAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol., v.166, n.4, p.557-80, 1983.

HANAWALT, P.C.; DONAHUE, B.A.; SWEDER, K.S. Repair and transcription. Collision or collusion? Curr. Biol., v.4, n.6, p.518-21, 1994.

HARMATZ, D.; BLAUER, G. Reactions of photoexcited methylene blue. Photochem. Photobiol., v.38, n.3, p.385-7, 1983.

HAYAKAWA, H.; TAKETOMI, A.; SAKUMI, K.; KUWANO, M.; SEKIGUCHI, M. Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. Biochemistry, v.34, n.1, p.89-95, 1995.

HELMA, C.; UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. Mutat. Res., v.466, n.1, p.9-15, 2000.

HEMNANI, T.; PARIHAR, M.S. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Indian J. Physiol. Pharmacol., v.42, n.4, p.440-52, 1998.

HENNING, K.A.; LI, L.; IYER, N.; MCDANIEL, L.D.; REAGAN, M.S.; LEGERSKI, R.; SCHULTZ, R.A.; STEFANINI, M.; LEHMANN, A.R.; MAYNE, L.V.; FRIEDBERG, E.C. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD

repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. Cell, v.82, n.4, p.555-64, 1995.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, v.411, n.6835, p.366-74, 2001.

HOFFMANN, M.E.; MENEHINI, R. Action of hydrogen peroxide on human fibroblast in culture. Photochem. Photobiol., v.30, n.1, p.151-5, 1979.

HOLANDINO, C.; CAPELLA, M.A.; ANGLUSTER, J.; SILVA-FILHO, F.C.; MENEZES, S.; ALVIANO, C.S. Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in *Escherichia coli*. Indian J. Biochem. Biophys., v.35, n.5, p.284-90, 1998.

HTUN, H.; JOHNSTON, B.H. Mapping adducts of DNA structural probes using transcription and primer extension approaches. Methods Enzymol., v.212, p.272-94, 1992.

INDIG, G.L.; ANDERSON, G.S.; NICHOLS, M.G.; BARTLETT, J.A.; MELLON, W.S.; SIEBER, F. Effect of molecular structure on the performance of triarylmethane dyes as therapeutic agents for photochemical purging of autologous bone marrow grafts from residual tumor cells. J. Pharm. Sci., v.89, n.1, p.88-99, 2000.

JAISWAL, M.; LIPINSKI, L.J.; BOHR, V.A.; MAZUR, S.J. Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways. Nucleic Acids Res., v.26, n.9, p.2184-91, 1998.

KAINA, B.; CHRISTMANN, M.; NAUMANN, S.; ROOS, W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair, Amsterdam, v.6, n.8, p.1079-99, 2007.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J.H.; VAN GENT, D.C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. Trends Cell. Biol., v.8, n.12, p.483-9, 1998.

KASSAM, S.N.; RAINBOW, A.J. Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.359, n.4, p.1004-9, 2007.

KISBY, G.E.; LESSELROTH, H.; OLIVAS, A.; SAMSON, L.; GOLD, B.; TANAKA, K.; TURKER, M.S. Role of nucleotide- and base-excision repair in genotoxin-induced neuronal cell death. DNA Repair, Amsterdam, v.3, n.6, p.617-27, 2004.

KLUNGLAND, A.; HOSS, M.; GUNZ, D.; CONSTANTINOU, A.; CLARKSON, S.G.; DOETSCH, P.W.; BOLTON, P.H.; WOOD, R.D.; LINDAHL, T. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. Mol. Cell., v.3, n.1, p.33-42, 1999.

KOBAYASHI, J.; IWABUCHI, K.; MIYAGAWA, K.; SONODA, E.; SUZUKI, K.; TAKATA, M.; TAUCHI, H. Current topics in DNA double-strand break repair. J. Radiat. Res., Tokyo, v.49, n.2, p.93-103, 2008.

KOCHEVAR, I.E.; LAMBERT, C.R.; LYNCH, M.C.; TEDESCO, A.C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. Biochim. Biophys. Acta., v.1280, n.2, p.223-30, 1996.

KOCHEVAR, I.E.; REDMOND, R.W. Photosensitized production of singlet oxygen. Methods Enzymol., v.319, p.20-8, 2000.

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, n.4, p.1388-96, 2007.

KUNG, H.C.; BOLTON, P.H. Structure of a duplex DNA containing a thymine glycol residue in solution. J. Biol. Chem., v.272, n.14, p.9227-36, 1997.

LAN, L.; NAKAJIMA, S.; OOHATA, Y.; TAKAO, M.; OKANO, S.; MASUTANI, M.; WILSON, S.H.; YASUI, A. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.101, n.38, p.13738-43, 2004.

LANGIE, S.A.; KNAAPEN, A.M.; HOUBEN, J.M.; VAN KEMPEN, F.C.; DE HOON, J.P.; GOTTSCHALK, R.W.; GODSCHALK, R.W.; VAN SCHOOTEN, F.J. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. Toxicol. Lett., v.168, n.3, p.302-9, 2007.

LARSEN, E.; KWON, K.; COIN, F.; EGLY, J.M.; KLUNGLAND, A. Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. DNA Repair, Amsterdam, v.3, n.11, p.1457-68, 2004.

LAZAROVA, M.; LABAJ, J.; ECKL, P.; SLAMENOVA, D. Comparative evaluation of DNA damage by genotoxicants in primary rat cells applying the comet assay. Toxicol. Lett., v.164, n.1, p.54-62, 2006.

LE PAGE, F.; KWOH, E.E.; AVRUTSKAYA, A.; GENTIL, A.; LEADON, S.A.; SARASIN, A.; COOPER, P.K. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. Cell, v.101, n.2, p.159-71, 2000.

LE PAGE, F.; KWOH, E.E.; AVRUTSKAYA, A.; GENTIL, A.; LEADON, S.A.; SARASIN, A.; COOPER, P.K. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. Cell, v.123, n.4, p.711, 2005.

LI, Q.; DING, L.; YU, J.J.; MU, C.; TSANG, B.; BOSTICK-BRUTON, F.; REED, E. Cisplatin and phorbol ester independently induce ERCC-1 protein in human ovarian carcinoma cells. Int. J. Oncol., v.13, n.5, p.987-92, 1998.

LI, Q.; ZHANG, L.; TSANG, B.; GARDNER, K.; BOSTICK-BRUTON, F.; REED, E. Phorbol ester exposure activates an AP-1-mediated increase in ERCC-1 messenger RNA expression in human ovarian tumor cells. Cell Mol. Life Sci., v.55, n.3, p.456-66, 1999.

LIM, P.; SADRE-BAZZAZ, K.; SHURTER, J.; SARASIN, A.; TERMINI, J. DNA damage and mutations induced by arachidonic acid peroxidation. Biochemistry, v.42, n.51, p.15036-44, 2003.

LIN, J.J.; SANCAR, A. A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. Biochemistry, v.28, n.20, p.7979-84, 1989.

LINDAHL, T.; WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. Science, v.286, n.5446, p.1897-905, 1999.

LIPINSKI, L.J.; HOEHR, N.; MAZUR, S.J.; DIANOV, G.L.; SENTURKER, S.; DIZDAROGLU, M.; BOHR, V.A. Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells. Nucleic Acids Res., v.27, n.15, p.3153-8, 1999.

LLOYD, R.S.; HANAWALT, P.C.; DODSON, M.L. Processive action of T4 endonuclease V on ultraviolet-irradiated DNA. Nucleic Acids Res., v.8, n.21, p.5113-27, 1980.

LOVELL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. Mutagenesis, v.23, n.3, p.171-82, 2008.

MAILLARD, O.; CAMENISCH, U.; BLAGOEV, K.B.; NAEGLI, H. Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair. Mutat. Res., v.658, n.3, p.271-86, 2008.

MAILLARD, O.; SOLYOM, S.; NAEGLI, H. An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. PLoS Biol., v.5, n.4, p.e79, 2007.

MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. Nature, v.355, n.6357, p.273-5, 1992.

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis, v.21, n.3, p.361-70, 2000.

MARNETT, L.J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, v.181-182, p.219-22, 2002.

MARTINEZ, G.R. Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, e estudos de lesões em DNA. -Doutorado-. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINEZ, G.R.; LOUREIRO, A.P.; MARQUES, S.A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L.F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E.A.; GARCIA, C.C.; BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. Mutat. Res., v.544, n.2-3, p.115-27, 2003.

MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. Quim. Nova, v.23, p.686-689, 2000.

MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.; RAVANAT, J.L.; CADET, J.; DI MASCIO, P. [18O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives. Biol. Chem., v.383, n.3-4, p.607-17, 2002.

MAYNE, L.V.; PRIESTLEY, A.; JAMES, M.R.; BURKE, J.F. Efficient immortalization and morphological transformation of human fibroblasts by transfection with SV40 DNA linked to a dominant marker. Exp. Cell Res., v.162, n.2, p.530-8, 1986.

MCMILLAN, S.; EDENBERG, H.J.; RADANY, E.H.; FRIEDBERG, R.C.; FRIEDBERG, E.C. den V gene of bacteriophage T4 codes for both pyrimidine dimer-DNA glycosylase and apyrimidinic endonuclease activities. J. Virol., v.40, n.1, p.211-23, 1981.

MCNAIR, F.I.; MARPLES, B.; WEST, C.M.; MOORE, J.V. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin. Br. J. Cancer, v.75, n.12, p.1721-9, 1997.

MELLISH, K.J.; COX, R.D.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S.B. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. Photochem. Photobiol., v.75, n.4, p.392-7, 2002.

MELLON, I.; BOHR, V.A.; SMITH, C.A.; HANAWALT, P.C. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.83, n.23, p.8878-82, 1986.

MENCK, C.F.; DI MASCIIO, P.; AGNEZ, L.F.; RIBEIRO, D.T.; OLIVEIRA, R.C. Genetic deleterious effects of singlet oxygen. Quim. Nova, v.16, n.4, p.328-336, 1993.

MENEZES, S.; CAPELLA, M.A.; CALDAS, L.R. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in Escherichia coli. J. Photochem. Photobiol. B, v.5, n.3-4, p.505-17, 1990.

MIAO, F.; BOUZIANE, M.; DAMMANN, R.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; PFEIFER, G.; O'CONNOR, T.R. 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins. J. Biol. Chem., v.275, n.37, p.28433-8, 2000.

MICHAELS, M.L.; TCHOU, J.; GROLLMAN, A.P.; MILLER, J.H. A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. Biochemistry, v.31, n.45, p.10964-8, 1992.

MOLLER, P.; WALLIN, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. Mutat. Res., v.410, n.3, p.271-90, 1998.

MORIWAKI, S.; KRAEMER, K.H. Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., v.17, n.2, p.47-54, 2001.

MULLER, E.; BOITEUX, S.; CUNNINGHAM, R.P.; EPE, B. Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. Nucleic. Acids. Res., v.18, n.20, p.5969-73, 1990.

O'DONOVAN, A.; DAVIES, A.A.; MOGGS, J.G.; WEST, S.C.; WOOD, R.D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. Nature, v.371, n.6496, p.432-5, 1994.

OLIVEIRA, C.S.D. Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristal de violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura. -Doutorado-. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OSTEROD, M.; LARSEN, E.; LE PAGE, F.; HENGSTLER, J.G.; VAN DER HORST, G.T.; BOITEUX, S.; KLUNGLAND, A.; EPE, B. A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. Oncogene, v.21, n.54, p.8232-9, 2002.

PETIT, C.; SANCAR, A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. Biochimie, v.81, n.1-2, p.15-25, 1999.

PETRAT, F.; PALUCH, S.; DOGRUOZ, E.; DORFLER, P.; KIRSCH, M.; KORTH, H.G.; SUSTMANN, R.; DE GROOT, H. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool. J. Biol. Chem., v.278, n.47, p.46403-13, 2003.

RAPP, A.; GREULICH, K.O. After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. J. Cell. Sci., v.117, n.Pt 21, p.4935-45, 2004.

RAVANAT, J.L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. J. Biol. Chem., v.276, n.8, p.40601-4, 2001.

RAVANAT, J.L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. J. Biol. Chem., v.275, n.51, p.40601-4, 2000.

REARDON, J.T.; BESSHO, T.; KUNG, H.C.; BOLTON, P.H.; SANCAR, A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.94, n.17, p.9463-8, 1997.

RICE, L.; WAINWRIGHT, M.; PHOEMIX, D.A. Phenothiazine photosensitizers. III. Activity of methylene blue derivatives against pigmented melanoma cell lines. J. Chemother., v.12, n.1, p.94-104, 2000.

ROHS, R.; SKLENAR, H.; LAVERY, R.; RÖDER, B. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. J. Am. Chem. Soc., v.122, p.2860-66, 2000.

RUCK, A.; KOLLNER, T.; DIETRICH, A.; STRAUSS, W.; SCHNECKENBURGER, H. Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers. J. Photochem. Photobiol. B, v.12, n.4, p.403-12, 1992.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, v.3. 2001

SANCAR, A. DNA excision repair. Annu. Rev. Biochem., v.65, p.43-81, 1996.

SANCAR, G.B. Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. Mutat. Res., v.451, n.1-2, p.25-37, 2000.

SATOH, M.S.; JONES, C.J.; WOOD, R.D.; LINDAHL, T. DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.90, n.13, p.6335-9, 1993.

SATOKATA, I.; TANAKA, K.; YUBA, S.; OKADA, Y. Identification of splicing mutations of the last nucleotides of exons, a nonsense mutation, and a missense mutation of the XPAC gene as causes of group A xeroderma pigmentosum. Mutat. Res., v.273, n.2, p.203-12, 1992.

SCHNEIDER, J.E.; PRICE, S.; MAIDT, L.; GUTTERIDGE, J.M.; FLOYD, R.A. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. Nucleic Acids Res., v.18, n.3, p.631-5, 1990.

SCHUL, W.; JANS, J.; RIJKSEN, Y.M.; KLEMMANN, K.H.; EKER, A.P.; DE WIT, J.; NIKAIIDO, O.; NAKAJIMA, S.; YASUI, A.; HOEIJMAKERS, J.H.; VAN DER HORST, G.T. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. Embo. J., v.21, n.17, p.4719-29, 2002.

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GUGLIOTTI, M.; GABRIELLI, D.S.; BAPTISTA, M.S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. Photochem. Photobiol., v.77, n.5, p.459-68, 2003.

SHACKELFORD, R.E.; INNES, C.L.; SIEBER, S.O.; HEINLOTH, A.N.; LEADON, S.A.; PAULES, R.S. The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. J. Biol. Chem., v.276, n.24, p.21951-9, 2001.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat. Rev. Cancer., v.3, n.3, p.155-68, 2003.

SHIMIZU, Y.; IWAI, S.; HANAOKA, F.; SUGASAWA, K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. Embo. J., v.22, n.1, p.164-73, 2003.

SHIVJI, M.K.; PODUST, V.N.; HUBSCHER, U.; WOOD, R.D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. Biochemistry, v.34, n.15, p.5011-7, 1995.

SHUCK, S.C.; SHORT, E.A.; TURCHI, J.J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. Cell Res., v.18, n.1, p.64-72, 2008.

SIES, H.; MENCK, C.F. Singlet oxygen induced DNA damage. Mutat. Res., v.275, n.3-6, p.367-75, 1992.

SIJBERS, A.M.; DE LAAT, W.L.; ARIZA, R.R.; BIGGERSTAFF, M.; WEI, Y.F.; MOGGS, J.G.; CARTER, K.C.; SHELL, B.K.; EVANS, E.; DE JONG, M.C.; RADEMAKERS, S.; DE ROOIJ, J.; JASPERS, N.G.; HOEIJMAKERS, J.H.; WOOD, R.D. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. Cell, v.86, n.5, p.811-22, 1996.

SIMON, M.I.; VAN VUNAKIS, H. The photodynamic reaction of methylene blue with deoxyribonucleic acid. J. Mol. Biol., v.4, p.488-99, 1962.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res., v.175, n.1, p.184-91, 1988.

SKOVSEN, E.; SNYDER, J.W.; LAMBERT, J.D.; OGILBY, P.R. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. J. Phys. Chem. B, v.109, n.18, p.8570-3, 2005.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat. Res., v.531, n.1-2, p.231-51, 2003.

SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; BONZHEIM, I.; TRENZ, K.; HOFFMANN, H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. Toxicol. Lett., v.146, n.2, p.151-8, 2004.

SPIVAK, G.; HANAWALT, P.C. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. DNA Repair, Amsterdam, v.5, n.1, p.13-22, 2006.

STARY, A.; SARASIN, A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. Biochimie, v.84, n.1, p.49-60, 2002.

STEVNSNER, T.; NYAGA, S.; DE SOUZA-PINTO, N.C.; VAN DER HORST, G.T.; GORGELS, T.G.; HOGUE, B.A.; THORSLUND, T.; BOHR, V.A. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. Oncogene, v.21, n.57, p.8675-82, 2002.

STUCKI, M.; JACKSON, S.P. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. DNA Repair, Amsterdam, v.5, n.5, p.534-43, 2006.

SUGASAWA, K.; NG, J.M.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; VAN DER SPEK, P.J.; EKER, A.P.; HANAOKA, F.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. Mol. Cell., v.2, n.2, p.223-32, 1998.

SUGASAWA, K.; OKAMOTO, T.; SHIMIZU, Y.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; HANAOKA, F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. Genes Dev., v.15, n.5, p.507-21, 2001.

SUGASAWA, K.; SHIMIZU, Y.; IWAI, S.; HANAOKA, F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. DNA Repair, Amsterdam, v.1, n.1, p.95-107, 2002.

SUNESSEN, M.; STEVNSNER, T.; BROSH JR, R.M.; DIANOV, G.L.; BOHR, V.A. Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. Oncogene, v.21, n.22, p.3571-8, 2002.

TAJIRI, T.; MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in Escherichia coli. Mutat. Res., v.336, n.3, p.257-67, 1995.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? Cancer Lett., v.229, n.2, p.171-9, 2005.

TCHOU, J.; BODEPUDI, V.; SHIBUTANI, S.; ANTOSHECHKIN, I.; MILLER, J.; GROLLMAN, A.P.; JOHNSON, F. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. J. Biol. Chem., v.269, n.21, p.15318-24, 1994.

TORNALETTI, S.; MAEDA, L.S.; KOLODNER, R.D.; HANAWALT, P.C. Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. DNA Repair, Amsterdam, v.3, n.5, p.483-94, 2004.

TROELSTRA, C.; VAN GOOL, A.; DE WIT, J.; VERMEULEN, W.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. Cell, v.71, n.6, p.939-53, 1992.

TUITE, E.M.; KELLY, J.M. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. J. Photochem. Photobiol. B, v.21, n.2-3, p.103-24, 1993.

TUO, J.; JARUGA, P.; RODRIGUEZ, H.; BOHR, V.A.; DIZDAROGLU, M. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. Faseb. J., v.17, n.6, p.668-74, 2003.

TUO, J.; MUFTUOGLU, M.; CHEN, C.; JARUGA, P.; SELZER, R.R.; BROSH, R.M., JR.; RODRIGUEZ, H.; DIZDAROGLU, M.; BOHR, V.A. The Cockayne Syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8-hydroxyguanine in DNA. J. Biol. Chem., v.276, n.49, p.45772-9, 2001.

VALERIE, K.; FRONKO, G.; LONG, W.; HENDERSON, E.E.; NILSSON, B.; UHLEN, M.; DE RIEL, J.K. Production and detection of coliphage T4 endonuclease V polyclonal and monoclonal antibodies using staphylococcal protein-A hybrid proteins. Gene, v.58, n.1, p.99-107, 1987.

VAN GOOL, A.J.; CITTERIO, E.; RADEMAKERS, S.; VAN OS, R.; VERMEULEN, W.; CONSTANTINOU, A.; EGLY, J.M.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. Embo J., v.16, n.19, p.5955-65, 1997.

VONARX, E.J.; MITCHELL, H.L.; KARTHIKEYAN, R.; CHATTERJEE, I.; KUNZ, B.A. DNA repair in higher plants. Mutat. Res., v.400, n.1-2, p.187-200, 1998.

WAGNER, S.J.; SKRIPCHENKO, A.; ROBINETTE, D.; FOLEY, J.W.; CINCOTTA, L. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. Photochem. Photobiol., v.67, n.3, p.343-9, 1998.

WAINWRIGHT, M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. Int. J. Antimicrob. Agents, v.21, n.6, p.510-20, 2003.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; RICE, L.; BURROW, S.M.; WARING, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. J. Photochem. Photobiol. B, v.40, n.3, p.233-9, 1997.

YANG, W. Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins. DNA Repair, Amsterdam, v.5, n.6, p.654-66, 2006.

YOU, Y.H.; LEE, D.H.; YOON, J.H.; NAKAJIMA, S.; YASUI, A.; PFEIFER, G.P. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. J. Biol. Chem., v.276, n.48, p.44688-94, 2001.