LEONARDO CARMO DE ANDRADE LIMA

RESPOSTAS A DANOS NO DNA ENVOLVIDAS NA
RECUPERAÇÃO DO BLOQUEIO DA REPLICAÇÃO E
TRANSCRIÇÃO EM CÉLULAS HUMANAS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2014

LEONARDO CARMO DE ANDRADE LIMA

Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do
bloqueio da replicação e transcrição em células humanas

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Carlos Frederico Martins Menck

Versão original

São Paulo

2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lima, Leonardo Carmo de Andrade.

Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do bloqueio da replicação e transcrição em células humanas / Leonardo Carmo de Andrade Lima. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resposta a danos no DNA.

Versão do título para o inglês: DNA damage responses involved in the recovery of replication and transcription blockage in human cells.

1. Danos no DNA 2. Radiação ultravioleta 3. Quimioterapia adjuvante
4. Transcrição gênica 5. Sequenciamento genético I. Menck, Prof.
Dr. Carlos Frederico Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB079/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leonardo Carmo de Andrade Lima.

Título da Tese: Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do bloqueio da replicação e transcrição em células humanas.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

PARECER 882/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 93ª reunião realizada em 24.003.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Interação entre vias de reparo de DNA e sinalização em resposta a danos através de silenciamento gênico"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo.Sr.
LEONARDO CARMO DE ANDRADE LIMA
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA</p>
---	---

Decl. CEP SH. 013/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao PARECER 882/CEP, de 24.03.2009, informo que o título do Projeto foi alterado para ***"Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do bloqueio de replicação e transcrição em células humanas"*** não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 06 de maio de 2014.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEP SH- ICB /USP

Dedicado à minha avó Berenice,
que já acreditava em mim e me chamava
de doutor desde quando entrei na graduação.

AGRADECIMENTOS

Estamos todos conectados. Essa tese, assim como toda pesquisa científica, é uma consequência de colaboração mútua. O conhecimento é um contínuo, o que implica que com esse trabalho, coloco mais um tijolo em cima da construção, mas isso só é possível porque alguém já havia colocado outros tijolos embaixo. Isaac Newton disse uma frase que resume a realidade dessa conquista:

“Se eu consegui ver mais que outros, foi porque estava em cima do ombro de gigantes”.

Esses gigantes que me fazem estar aqui hoje são todos os pesquisadores citados nesta tese, mas não só eles. Todos que contribuíram a carregar o tijolo também. Desde os funcionários do ICB que trazem nitrogênio líquido para armazenar as células até os professores e orientadores desde a graduação que me fizeram compreender melhor como funciona essa célula. Porém, isso tudo só é possível por causa dos impostos pagos por todos para sustentar a Universidade de São Paulo, portanto é graças ao esforço e trabalho de toda população.

Porém, gostaria de agradecer especialmente algumas pessoas que contribuíram mais diretamente com meu caminho até aqui:

Primeiramente, quero dizer que devo minhas escolhas ao Mundo de Beakman, programa educacional de ciência que passava na TV Cultura quando tinha 6-8 anos de idade. Muito obrigado por me apresentar ciência de uma maneira tão fascinante e divertida!

Em seguida, agradeço à minha família! Pai e mãe, agora que eu estou mais velho, compreendo melhor todo esforço e sacrifício para conseguir educar um filho. Nossas características como pessoa são consequências da genética e do ambiente, e vocês – além da genética - proporcionaram um ambiente propício e fértil para a educação dos três filhos. Muito obrigado! Pri e Dani, muito obrigado por suportar um irmão caçula bem mais novo que copiava muito do que faziam (aprender a sambar, jogar basquete etc..). Saibam que vocês foram modelos importantes em minha vida, ou seja, também são culpados pelo que sou hoje! Finalmente aos membros mais recentes Fabiano, Lilian e Gui, que chegaram dando mais alegrias à família. Muito obrigado!

Biologia USP! Foram anos memoráveis, com professores incríveis e amigos para uma vida inteira. Muito obrigado pela convivência, conversas e piadas: Capiar da Roça, Alegria, CET, Pelúcia, CPF, Gozzoli, Diogo, Dé, toda girafada que passou pelo time de basquete da Bio – Lamarck Basquetebol Arte – e pelos loucos mentais do time de futsal (sienta!).

Agora, um especial agradecimento ao amor da minha vida, minha esposa Gisella Grazioli, agora de Andrade Lima! Seu amor me fortalece, dando motivos para fazer tudo

valer a pena. Você estava junto desde o final da graduação, viu minha iniciação científica e acompanhou todo amadurecimento durante esses 5 anos. É fato que teve que aguentar momentos de desânimo profundo que tive com meu doutorado, além de 10 meses distantes por 8200 km se vendo somente por Skype... Por isso, eu peço desculpas... Mas saiba que você sempre foi minha musa inspiradora e que não estaria aqui sem seu suporte e companheirismo. Essa é apenas mais uma etapa de nossas vidas, repleta de muitos planos até ficarmos bem velhinhos juntos. Te amo pra sempre!

Muito obrigado ao laboratório de Reparo de DNA e ao professor Menck que aceitou um moleque de 19 anos de idade, sem experiência, sem noção do que era pesquisa, cujo único ponto positivo era ser torcedor do Palmeiras, e mesmo assim me ofereceu uma segunda casa durante 8 anos. Com certeza, saio do lab com outra cabeça, outra visão de mundo e isso não seria possível sem essa convivência e trocas de experiências. Espero ter contribuído um pouco para o laboratório em retribuição ao que ele me proporcionou.

Agradeço também aos colegas do lab e co-orientadores. Em especial à Kero, Lu A e Stephano, que me ensinaram desde cultura de célula, citometria à imunofluorescência e ficaram mais perto me ensinando também o pensamento científico. Foram várias gerações de colegas nestes oito anos e muitas caixinhas de final de ano: Melissa, Ric, Carol Berra, Marinas, Portuga, Apuã, Carol Quayle, Raquel, Helots, Regina, Tati, Dani Solthys, André, Maria Helena, Wa, Bárbara, Lu V, Tomás, Valéria, Alê, Letícia, Débora, Teiti, Luís Guilherme, Juliana, Marioly, Maribel, Rodrigo, Carol Strano, Janu e Rosa, Annabel, Camila, Vítor, Clarissa, Magna, Lígia, Vânia, Lu Gomes, Alessandra, Veri, Raquelzinha, Edu, Satoru, Nati, Francisco, Huma, Lívia, Tiago, Davi Jardim, Davi Mendes...

Um agradecimento em especial ao professor Mats Ljungman, da Universidade de Michigan, pela oportunidade de doutorado sanduíche, além da gentileza, hospitalidade e paciência na discussão dos resultados. Obrigado também à Michelle Paulsen e Artur Veloso pela amizade e por me ajudarem de perto durante o período em Michigan.

Obrigado ao cursinho do Núcleo de Consciência Negra e da Rede Emancipa pela experiência de vida e possibilidade de dar aulas, a qual me fez pesquisar, refletir e consolidar em minha cabeça a essência do que é ciência e poder passar isso a outras pessoas.

Por fim, agradeço à Universidade de São Paulo, ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas e seus funcionários pela infraestrutura que possibilitou essa tese. Em especial à FAPESP, pelo financiamento tanto de minha bolsa quanto de reagentes para o laboratório e à CAPES pela possibilidade de bolsa de doutorado sanduíche.

“Que a força esteja com você”
Mestre Yoda

RESUMO

ANDRADE-LIMA, LC. **Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do bloqueio da replicação e transcrição em células humanas.** 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A luz ultravioleta (UV) pode bloquear a replicação e transcrição do DNA devido à formação de lesões que distorcem a dupla hélice do DNA. Replicação dessas lesões ocorre através da troca para polimerases especializadas em síntese translesão e, em resposta a luz UV, células ativam a sinalização mediada pela quinase ATR. Nós descobrimos que o silenciamento de ATR promove a indução precoce de apoptose após irradiação com luz UVB em fibroblastos humanos imortalizados com SV40. Células XP-V (deficientes na DNA polimerase translesão η) foram sensibilizadas ainda mais ao silenciamento. Entretanto, nós descobrimos que, mesmo células SV40 proficientes em reparo de DNA e síntese translesão, foram incapazes de alcançar a mitose após depleção de ATR, como seria esperado após a perda do controle de pontos de checagem em resposta a danos no DNA. Assim, ATR regula a recuperação do bloqueio da replicação de maneira independente de pol η em células imortalizadas com SV40, que assim com na maioria de células tumorais, são deficientes no ponto de parada da fase G1 mediado por p53. Descobrimos ainda, que a depleção de ATR também representa um alvo promissor para sensibilizar tumores com mutações em p53 à quimioterápicos que bloqueiam a replicação, como cisplatina. Além disso, depleção de ATR também sensibilizou ao tratamento com o indutor de estresse oxidativo cloroquina, cujo tipo de danos no DNA ainda não havia sido relacionado à resposta celular mediada por esta quinase e aumenta o potencial farmacêutico da modulação de ATR no tratamento antitumoral. Além do bloqueio da replicação, danos no DNA comprometem a síntese de RNA. Porém, não existem RNA polimerases especializadas em translesão da transcrição e desse modo, as células dependem do reparo de DNA acoplado à transcrição (TCR) – mais eficiente que o reparo global (GGR) – para que seja possível recomeçar a síntese de RNA. Porém, essa maior eficiência foi descrita em estudos analisando apenas alguns genes e extrapolado como igual para todo o genoma humano, com cerca de 23 mil genes com diferentes tamanhos, expressão gênica e marcação epigenética. Assim, utilizamos metodologia baseada em sequenciamento de nova geração para mapear RNA nascentes e analisar a recuperação da transcrição em escala genômica. Nós confirmamos que genes mais longos são mais inibidos por luz UV, devido ao bloqueio do alongamento ao longo dos genes, mas sem afetar a iniciação da transcrição. Fibroblastos normais recuperam a síntese de RNA 24 após a irradiação, enquanto células deficientes em GGR apresentam atraso somente em genes longos e células deficientes em TCR, inclusive em genes menores. O nível de expressão gênica não contribui para a recuperação da transcrição, sugerindo que o reconhecimento da lesão não é um fator limitante nesse processo. Através de quantificação da remoção de lesões no DNA, observamos que a eficiência de reparo de DNA é a mesma entre genes com perfis diferentes recuperação da transcrição, o que indica que a remoção de lesões no DNA não explica totalmente a recuperação da transcrição e, assim, outros níveis de regulação devem existir para que a síntese de RNA recomece.

Palavras-chave: Danos no DNA. Radiação ultravioleta. Quimioterapia adjuvante. Transcrição gênica. Sequenciamento genético.

ABSTRACT

ANDRADE-LIMA, LC. **DNA damage responses involved in the recovery of replication and transcription blockage in human cells.** 2014. 148 f. PhD thesis (Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Ultraviolet (UV) light can block DNA replication and transcription due to the formation of lesions that distort the double helix of DNA. Replication through such lesions occurs after the exchange with translesion synthesis specialized polymerases and in response to UV light, cells activate ATR kinase signaling. We found that ATR silencing promotes early induction of apoptosis after UVB light in human fibroblasts immortalized with SV40. XP - V cells (deficient in DNA translesion polymerase η) were further sensitized to ATR silencing. However, we discovered that even SV40 cells proficient in DNA repair and translesion synthesis were unable to reach mitosis after ATR depletion, as it would be expected after loss of checkpoints in response to DNA damage. Thus, ATR regulates the recovery of replication arrest independently of pol η in SV40-immortalized cells that are deficient in p53 G1 phase checkpoint, as the majority of tumor cells. We further found that depletion of ATR is also a promising target for sensitizing tumors with p53 mutations to chemotherapeutic that block replication, such as cisplatin. Furthermore, depletion of ATR also sensitized to treatment with the oxidative stress inducer chloroquine, which DNA damage was not yet related to cellular response mediated by this kinase and increases the potential to modulate ATR anti -tumor treatment. In addition to blocking the replication, DNA damage arrest the synthesis of RNA. However, there are no known specialized translesion RNA polymerases and thereby cells depend on the transcription coupled DNA repair (TCR) - more efficient than the global repair (GGR) - to restart RNA synthesis. However, this increased efficiency has been described in studies that analyzed only a few genes and extrapolated this feature to be equal to the entire human genome, with about 23 000 genes with different size, gene expression and epigenetic marking. Thus, we developed a methodology based on next-generation sequencing to map and analyze the nascent RNA transcription recovery genome-wide. We confirmed that longer genes are more inhibited following UV light and while normal human fibroblasts recovered RNA synthesis 24 hours post-irradiation, GGR -deficient cells exhibit delay only at long genes and TCR -deficient cells exhibit delay even in shorter genes. The level of gene expression does not contribute to the recovery of transcription, suggesting that recognition of the lesion is not a limiting factor in this process. Quantitation of DNA damage removal, we found that the efficiency of DNA repair is the same among genes with different recovery of transcription profiles, indicating that DNA repair does not fully explain the recovery of transcription and further regulation is involved in resumption of RNA synthesis.

Key-words: DNA damage. Ultraviolet radiation. Adjuvant chemotherapy. Genetic transcription. Genetic sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. O núcleo celular e o empacotamento do DNA. _____	22
Figura 1.2. Linha do tempo com principais trabalhos e descobertas em relação à resposta ao dano no DNA. _____	23
Figura 1.3. A reatividade da molécula de DNA. _____	25
Figura 1.4. Luz UV: indução de danos no DNA e transformação em mutações pontuais. _____	26
Figura 1.5. Possibilidades após bloqueio da RNA polimerase diante a uma lesão. _____	28
Figura 1.6. Modelos de Síntese Translesão. _____	30
Figura 1.7. Mecanismos alternativos de tolerância a danos no DNA. _____	32
Figura 1.8. Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos. _____	33
Figura 1.9. Sobrevivência de células com mutações proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos ou em síntese translesão, após irradiação com luz UVB. _____	34
Figura 1.10. Resposta ao dano no DNA após luz UV: Integrando ciclo celular com tolerância e reparo de DNA. _____	36
Figura 1.11. Danos no DNA resultam em uma ampla resposta celular para diminuir a instabilidade genômica e tumorigênese. _____	38
Figura 2.1. Padronização do silenciamento de ATR por siRNA. _____	46
Figura 2.2. A depleção da quinase ATR sensibiliza fibroblastos imortalizados com SV40 à luz UVB. _____	47
Figura 2.3. ATR reprime ativação precoce de caspase-3 após luz UVB. _____	48
Figura 2.4. Depleção de ATR aumenta marcação pan-nuclear em fase S de γ H2AX. _____	50
Figura 2.5. ATR promove a recuperação da replicação e ativa parada do ciclo celular na fase G2 em células imortalizadas por SV40, após irradiação com luz UVB. _____	51
Figura 2.6. Fibroblastos com depleção de ATR iniciam síntese de DNA, mas são incapazes de alcançar mitose após irradiação com luz. _____	52
Figura 2.7. Comparação entre o inibidor cafeína e silenciamento de ATR por siRNA após luz UV em células XP-V. _____	54
Figura 2.8. A depleção de ATR afeta o reparo de fotoprodutos em fase S, além de recuperação de transcrição, após irradiação com luz UVB, em fibroblastos humanos imortalizados por SV40. _____	56
Figura 2.9. Modelo da participação da quinase ATR na proteção da replicação de DNA lesionado por luz UVB. _____	63
Figura 2.10. Espectro de emissão da lâmpada de UVB utilizada neste projeto _____	65
Figura 3.1. Depleção de ATR reduz proliferação celular de linhagens tumorais deficientes em p53. _____	75
Figura 3.2. Perfil do ciclo celular após silenciamento de ATR, em células de glioma humanos, mostra complicações em fase S, mesmo sem indução exógena de danos no DNA. _____	76
Figura 3.3. Depleção de ATR potencializa sensibilização induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53. _____	77
Figura 3.4. Depleção de ATR potencializa indução de apoptose e alteração no ciclo celular induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53. _____	78

Figura 3.5. Depleção de ATR também potencializa morte celular induzida por cloroquina e este efeito é anulado pelo antioxidante N-acetil L-cisteína .	80
Figura 3.6. Modelo de como a depleção de ATR contribui na potencialização do quimioterápico cisplatina.	82
Figura 3.7. Modelo de como a depleção de ATR contribui na potencialização do tratamento com cloroquina.	85
Figura 3.8. Modelo de como sensibiliza células após danos no DNA.	86
Figura 3.9. Ensaio de viabilidade celular por XTT.	89
Figura 4.1. Dados obtidos com técnica Bru-Seq.	92
Figura 4.2. Irradiação com luz UVC inibe a elongação, mas não a iniciação da transcrição, de maneira dependente com o comprimento do gene.	93
Figura 4.3. Recuperação da transcrição após 10 J/m ² de luz UVC em genes longos (>100 kpb) em fibroblastos primários humanos deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos, através de Bru-Seq.	95
Figura 4.4. Genes altamente expressos ou induzidos por UVC não apresentam recuperação da transcrição mais eficiente.	97
Figura 4.5. Recuperação da transcrição após 10 J/m ² de luz UVC em genes alvos de p53, através de Bru-Seq.	98
Figura 4.6. Recuperação da transcrição após 10 J/m ² de UVC de genes com expressão distinta.	100
Figura 4.7. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens.	101
Figura 4.8. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em XPC.	102
Figura 4.9. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em CSB.	103
Figura 4.10. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 20 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens.	104
Figura 4.11. Análise da recuperação de transcrição, após luz UVC, de RNAs não codificante.	112
Figura 4.12. Genes com eficiências de recuperação da transcrição distintas após 10 J/m ² de luz UVC, através de Bru-Seq.	114
Figura 4.13. Quantificação de reparo de DNA acoplado à transcrição em genes específicos, após 10 J/m ² de luz UVC, através de XL-PCR ATR em fibroblastos XP-C.	115
Figura 4.14. Quantificação de reparo de DNA acoplado à transcrição apenas da fita transcrita em genes específicos, após 10 J/m ² de luz UVC, através de XL-PCR ATR em fibroblastos XP-C.	116
Figura 4.15. Modelo de recuperação da transcrição após luz UVC.	124
Figura 4.16. Diagrama ilustrativo com o resumo da técnica de Bru-Seq.	126
Figura 4.17. Diagrama ilustrativo com resumo da técnica de quantificação de reparo de DNA por PCR longo.	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Resumo das principais síndromes causadas por mutações em vias de resposta ao dano no DNA e sua predisposição à tumorigênese. _____	41
Tabela 4.1. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. _____	106
Tabela 4.2. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em XPC. _____	107
Tabela 4.3. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em CSB. _____	108
Tabela 4.4. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 20 J/m ² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. _____	109
Tabela 4.5. Informações do sequenciamento por Bru-Seq de cada amostra e porcentagem de RNA ribossômico e mitocondrial. _____	110
Tabela 4.6. Lista de <i>primers</i> de XL-PCR utilizados neste projeto _____	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3' (END):** Extremidade 3' do gene (final da transcrição)
- 5' (TSS):** Extremidade 5' do gene (início da transcrição)
- 6-4 PP:** 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4 pirimidina-pirimidona)
- ATM:** Ataxia telangiectasia mutada
- ATR:** Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3
- BCNU:** Bis-cloroetilnitrosouréia
- BER:** *base excision repair* (reparo por excisão de bases)
- BrdU:** Bromodeoxiuridina
- BrU:** Bromouridina
- BSA:** *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovino)
- CPD:** *cyclobutane pyrimidine dimers* (dímeros de pirimidina ciclobutano)
- CQ:** cloroquina
- CS:** *Cockayne syndrome* (síndrome de Cockayne)
- DEPC:** Dietilpirocarbonato
- DDR:** *DNA damage response* (Resposta ao dano no DNA)
- DMEM:** *Dulbecco's modified eagle's medium*
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- rDNA:** RNA ribossômico
- cDNA:** DNA complementar
- DSB:** *double strand break* (quebra de dupla fita da molécula de DNA)
- DSE:** *double strand end* (quebra de dupla fita em forquilha de replicação)
- GGR-NER:** *global genome repair* (reparo do genoma global)
- hpi:** *hours post irradiation* (horas após a irradiação)
- HPV:** Human papillomavirus (Vírus do papiloma humano)
- HCR:** *host cell reactivation*
- Kbp:** *kilo base pairs* (mil pares de base)
- Kd:** *kinase dead* (quinase inativa)
- miRNA:** microRNA
- MMP:** *Matrix metalloproteinase*
- MMS:** Metil metanosulfonato
- mRNA:** RNA mensageiro
- mtDNA:** DNA mitocondrial

NAC: N-acetilcisteína

NHEJ: *Non-homologous end joining* (reparo por ligação de extremidades não-homólogas)

NER: *nucleotide excision repair* (reparo por excisão de nucleotídeos)

PBS: *phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PI: *propidium iodide* (iodeto de propídeo)

RPA: *replication protein A* (proteína de replicação A)

rRNA: RNA ribossômico

RT-PCR: transcrição reversa por reação de polimerase em cadeia

SFB: soro fetal bovino

SCE: *sister chromatid exchange* (troca entre cromátides-irmãs)

siATR: siRNA tendo ATR como alvo

siCtrl: siRNA controle, não tendo alvo no genoma humano

siRNA: *small interfering RNA* (pequeno RNA interferente)

SOS : Resposta global a danos no DNA em bactérias (incluindo aumento de mutagênese)

ssDNA: *single stranded DNA* (DNA simples fita)

SV40: *simian virus 40*

TCR-NER: *transcription coupled repair* (reparo acoplado à transcrição)

RNAPII: RNA polimerase II

RPKM: *reads per kilo base per million mapped reads* (leituras por mil bases por milhão de sequências mapeadas)

TMZ: temozolomida

TLS: *translesion synthesis* (síntese translesão)

TTD: tricotiodistrofia

UV: luz ultravioleta

UVB: luz ultravioleta no comprimento de onda de 280 a 315 nm

UVC: luz ultravioleta no comprimento de onda de 200 a 280 nm

UV^S: *UV-sensitive syndrome* (síndrome UV-sensível)

XP: Xeroderma Pigmentosum

XP-A: Paciente XP, deficiente na proteína XPA

XP-C: Paciente XP, deficiente na proteína XPC

XP-V: Paciente XP, deficiente na proteína pol η

XTT: sal tetrazolium

PREFÁCIO

Este trabalho visa compreender melhor como células respondem a danos no DNA que causam bloqueios tanto da replicação do DNA quanto da transcrição de RNA.

A tese foi organizada em capítulos devido à divisão do projeto em 3 partes, com a intenção de geração de 3 manuscritos distintos para publicação em revistas científicas. O capítulo 1 é uma introdução geral sobre danos no DNA e respostas celulares a esses agentes e contém os objetivos da tese divididos em três partes:

No capítulo 2, estudamos como células lidam com danos no DNA induzidos por luz ultravioleta B que bloqueiam a replicação, focando na sinalização da quinase ATR. Devido aos resultados promissores obtidos no capítulo 2 em relação à sensibilização de células, investigamos no capítulo 3 o potencial da modulação da resposta ao dano no DNA mediado pela quinase ATR como adjuvante na sensibilização de quimioterápicos em linhagens tumorais. Por fim, no capítulo 4, desenvolvemos um projeto inovador em conjunto com o prof. Mats Ljungman da Universidade de Michigan, EUA, onde tive a oportunidade de realizar estágio de doutorado sanduíche. Neste trabalho, avaliamos a resposta celular frente ao bloqueio da transcrição induzido por luz ultravioleta em escala genômica. Cada um desses capítulos contém sua introdução, resultados, discussão e materiais e métodos, formatados visando futura publicação de cada trabalho em um manuscrito diferente.

As conclusões gerais da tese são apresentadas no capítulo 5, juntamente com todas as referências bibliográficas e súmula curricular de minha atividade científica neste período de doutorado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS GERAIS

1.1 Núcleo: governando a cidade celular	21
1.2 A reatividade do DNA e necessidade de reparo	22
1.3 Luz UV e consequências dos fotoprodutos	24
1.4 Dímeros durante a transcrição	27
1.5 Dímeros durante a replicação – Síntese Translesão e mecanismos alternativos	29
1.6 Removendo dímeros – Reparo por Excisão de Nucleotídeos	31
1.7 Diante de tantas ameaças: Sinalização e controle do Ciclo Celular	35
1.8 ATM e ATR: os controladores de desastres no DNA	37
1.9 Síndromes relacionadas a defeitos em vias de reparo de DNA	39
1.10 Objetivo da Tese:	42

CAPÍTULO 2 - COMO CÉLULAS LIDAM COM DANOS NO DNA INDUZIDOS POR LUZ ULTRAVIOLETA B DURANTE A REPLICAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 RESULTADOS	45
2.2.1 A redução da quinase ATR sensibiliza fibroblastos imortalizados com SV40 à luz UVB	45
2.2.2 ATR reprime ativação precoce de caspase-3 após luz UVB	46
2.2.3 Depleção de ATR aumenta marcação pan-nuclear em fase S de γ H2AX após baixas doses de UVB em células XP-C e XP-V.	47
2.2.4 ATR promove a recuperação da replicação e ativa parada do ciclo celular na fase G2 em células imortalizadas por SV40, após irradiação com luz UVB.	49
2.2.5 Células humanas deficientes em ATR são incapazes de finalizar replicação após irradiação com luz UVB	51
2.2.6 Cafeína: O efeito de um inibidor seria o mesmo do que o do silenciamento de ATR?	53
2.2.7 A depleção de ATR pode afetar reparo de fotoprodutos em fase S, além de recuperação de transcrição.	55
2.3 DISCUSSÃO	57
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	64
2.4.1 Cultura celular	64
2.4.2 Congelamento e descongelamento de células	64
2.4.3 Irradiação com luz UVB	65

2.4.4 Drogas e tratamento (cafeína e nocodazol)	65
2.4.5 Silenciamento por siRNA	66
2.4.6 Western Blot	66
2.4.7 PCR em tempo real	68
2.4.8 Sobrevivência clonogênica	69
2.4.9 Ensaio de citometria de fluxo – Fragmentação de DNA e ciclo celular	69
2.4.10 Detecção de γ H2AX ou Caspase 3 em função do ciclo celular por citometria de fluxo	70
2.4.11 Detecção de BrdU ou CPD em função do ciclo celular em citometria de fluxo	71
2.4.12 Imunofluorescência	72
2.4.13 Análise estatística	72

CAPÍTULO 3 - POTENCIALIZAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS PELA SENSIBILIZAÇÃO DA RESPOSTA AO DANO NO DNA

3.1 INTRODUÇÃO	73
3.2 RESULTADOS	74
3.2.1 Depleção de ATR reduz proliferação celular de linhagens tumorais deficientes em p53	74
3.2.2 Depleção de ATR potencializa morte celular induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53.	75
3.2.3 Depleção de ATR também potencializa morte celular induzida por cloroquina e este efeito é anulado pelo antioxidante N-acetil L-cisteína.	79
3.3 DISCUSSÃO	81
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.4.1 Cultura celular	88
3.4.2 Drogas e tratamento (cisplatina, cloroquina e NAC)	88
3.4.3 Silenciamento por siRNA	88
3.4.4 Ensaio de citometria de fluxo – Fragmentação de DNA e ciclo celular	88
3.4.5 Determinação de viabilidade celular por XTT	89
3.4.6 Proliferação celular com XCelligence	89
3.4.7 Análise estatística	89

CAPÍTULO 4 - RECUPERAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO APÓS LUZ UV EM ESCALA GENÔMICA

4.1 INTRODUÇÃO	90
4.2 RESULTADOS	91
4.2.1 Bru-Seq, uma nova abordagem para análise individual da síntese de RNA de genes em escala genômica.	91
4.2.2 Irradiação com luz UVC inibe a elongação, mas não a iniciação da transcrição.	92
4.2.3 Indução ou inibição da transcrição é influenciada pelo comprimento do gene.	93
4.2.4 Reparo global por excisão de nucleotídeos contribui para a recuperação de transcrição em genes longos, após irradiação com luz UVC.	94
4.2.5 Genes altamente expressos ou induzidos por UVC não apresentam recuperação da transcrição mais eficiente.	96
4.2.6 Síntese de RNA de genes induzidos por 10 J/m ² luz UVC retorna ao nível basal 24 hpi em fibroblastos selvagens, mas não em células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeo.	96
4.2.7 Luz UVC induz síntese de RNA de genes envolvidos em regulação do reparo de DNA, processamento de RNA, regulação de tradução, ciclo celular, apoptose e autofagia.	101
4.2.8 A inibição da transcrição causada por luz UVC afeta genes da organização do citoesqueleto, adesão celular, endocitose e mitose.	104
4.2.9 Síntese de RNA mitocondrial e rRNA não é inibida devido à grande quantidade de cópias de DNA e ao tamanho reduzido dos transcritos.	105
4.2.10 Extremidades 3' de genes longos são reparadas mais lentamente, porém reparo de DNA não explica completamente a eficiência de recuperação de transcrição após luz UVC.	113
4.3 DISCUSSÃO	117
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS	125
4.4.1 Linhagens celulares	125
4.4.2 Bru-Seq: Avaliação da recuperação da transcrição após danos no DNA em escala genômica (Fig. 46)	126
4.4.3 XL-PCR (<i>Extra long polymerase chain reaction</i>) para quantificar reparo de DNA	128

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES	131
5.2 REFERÊNCIAS	133
5.3 APÊNDICE A - SÚMULA CURRICULAR	145
5.3.1 PRÊMIOS E HONRAS EM CONGRESSOS	145
5.3.2 ARTIGOS PUBLICADOS	145

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS GERAIS

1.1 Núcleo: governando a cidade celular

A informação necessária para construir um ser humano está contida em 46 moléculas de DNA envoltas em complexos proteicos. Quando somados, são aproximadamente $3,2 \times 10^9$ nucleotídeos que chegariam a quase dois metros de comprimento se fossem esticados, tudo isso alocado dentro de um núcleo com cerca de apenas 6 μm de diâmetro. Para isso, o DNA é compactado em estruturas designada de nucleossomos, em que cerca de 200 pares de bases são enovelados em octâmeros de proteínas básicas, as histonas. Dessa forma, a consequência da organização da cromatina é que a maior parte do DNA fica estruturalmente inacessível e funcionalmente inativa, sendo necessária uma regulação dinâmica da estrutura da cromatina para que os processos de transcrição e replicação de DNA possam acontecer (ALBERTS et al., 2008).

No genoma humano, estima-se que cerca de 50% apresenta sequências altamente repetitivas, enquanto apenas 1% sejam sequências codificadores, constituindo exons de ao menos 23000 genes. Esses genes possuem muita variação de tamanho (de poucas centenas a 2 milhões pares de bases), incluindo variação no número de exons e tamanho dos introns (STRACHAN; READ, 2004).

Entretanto, ainda não conseguimos compreender completamente a atividade orquestrada dos milhares de genes somente baseada na sequência de DNA. A organização do genoma no núcleo também contribui para o funcionamento da transcrição, replicação e reparo de DNA (CREMER; CREMER, 2001; LANCTÔT et al., 2007; MISTELI; SOUTOGLOU, 2009). É conhecido que cromossomos individuais ocupam posições distintas dentro do núcleo, conhecidos como territórios cromossômicos (Fig. 1.1). Como resultado de diferentes níveis de compactação, diferentes segmentos de cromossomos adotam uma complexa topologia dentro de seu território. Além disso, existe uma distribuição nuclear em que cromossomos mais ricos em genes tendem a ocupar posições mais internas, enquanto cromossomos com poucos genes tendem a ficar na periferia nuclear, sendo essa disposição conservada durante a evolução dos primatas (TANABE et al., 2002).

Figura 1.1. O núcleo celular e o empacotamento do DNA. A molécula de DNA é densamente enovelada em histonas e sua distribuição dentro do núcleo não é aleatória. Cromossomos ocupam territórios distintos, sendo observado que cromossomos ricos em genes ocupam posição mais interna no núcleo. A distribuição espacial dentro do núcleo é determinada pela interação da cromatina com a lâmina (ou matriz) nuclear localizada na periferia.

1.2 A reatividade do DNA e necessidade de reparo

“Nós não consideramos o possível papel de... reparo [de DNA] embora... eu mais tarde vim a perceber que o DNA é tão precioso que provavelmente diversos mecanismos de reparo devam existir” – (CRICK, 1974)

A percepção inicial sobre o DNA era relacionada a uma macromolécula altamente estável, porém somente algum tempo depois que a estrutura da dupla-hélice foi desvendada por Watson e Crick que foi compreendida a instabilidade natural do DNA, devido à sua estrutura química e reatividade com numerosa quantidade de agentes químicos e físicos. Curiosamente, muito antes da constatação de que DNA era o material hereditário das células em 1944, já era conhecido que agentes ambientais como raios-X induziam mutações

(MULLER, 1927) e que células tinham habilidade inata de se recuperar de irradiação com luz ultravioleta (UV), mesmo sem saber exatamente que tipo de dano era induzido em células (HOLLAENDER; CLAUS, 1936). O primeiro mecanismo de recuperação celular – a fotorreativação – foi descrito em 1949 (KELNER, 1949) e na década de 60 foi desvendada a natureza da lesão no DNA provocada por luz UV e o mecanismo independente de luz – o reparo por excisão de nucleotídeos. Ao longo do tempo, outros tipos de danos no DNA, além dos induzidos por radiações, foram descritos reafirmando a reatividade da molécula de DNA e a necessidade de correção das lesões. A figura 1.2 resume alguns trabalhos de destaque que contribuíram para o entendimento da resposta celular ao dano no DNA através de uma linha do tempo, adaptada da revisão de Mats Ljungman (LJUNGMAN, 2010).

Figura 1.2. Linha do tempo com principais trabalhos e descobertas em relação à resposta ao dano no DNA. O número em parênteses corresponde ao ano de publicação do trabalho e foi adaptada da revisão de Ljungman, 2000. 1 - (MULLER, 1927); 2 - (HOLLAENDER; CLAUS, 1936); 3 - (KELNER, 1949); 4 - (WATSON; CRICK, 1953); 5 - (KANAZIR; ERRERA, 1954); 6 - (RUPERT; GOODGAL; HERRIOTT, 1958); 7 - (BEUKERS; BERENDS, 1960); 8 - (MASTERS; PARDEE, 1962); 9 - (BOYCE; HOWARD-FLANDERS, 1964; SETLOW; CARRIER, 1964); 10 - (HOLLIDAY, 1964); 11 - (RUPP; HOWARD-FLANDERS, 1968); 12 - (CLEAVER, 1968); 13 - (LINDAHL, 1974); 14 - (WITKIN, 1974); 15 - (WAGNER; MESELSON, 1976); 16 - (LANE; CRAWFORD, 1979; LINZER; LEVINE, 1979); 17 - (WILSON; BERGET; PIPAS, 1982); 18 - (MELLON; SPIVAK; HANAWALT, 1987); 19 - (KASTAN et al., 1991); 20 - (KASTAN et al., 1992); 21 - (WALWORTH; DAVEY; BEACH, 1993); 22 - (FISHEL et al., 1993); 23 - (VAN DER KEMP et al., 1996); 24 - (ROGAKOU et al., 1998); 25 - (MATSUOKA; HUANG; ELLEDGE, 1998); 26 - (MASUTANI et al., 1999); 27 - (TIBBETTS et al., 1999); 28 - (DE BOER et al., 2002); 29 - (KANNOUCHE; WING; LEHMANN, 2004); 30 - (BARTKOVA et al., 2005; GORGOLIS et al., 2005); 31 - (MATSUOKA et al., 2007; STOKES et al., 2007); 32 - (SUGASAWA et al., 2009).

Danos no DNA são alterações químicas da dupla-hélice que desafiam constantemente a estabilidade genômica, já que podem comprometer o metabolismo de DNA (tanto replicação e transcrição) e serem transformados em mutações ou aberrações cromossômicas. Assim, desempenham importante papel nos processos biológicos de carcinogênese e envelhecimento em humanos (FRIEDBERG, 2003; MENCK; MUNFORD, 2014; SCHUMACHER; GARINIS; HOEIJMAKERS, 2008; SHEN, 2011). Hoje sabemos diversas causas das modificações no DNA. Milhares de purinas são perdidas todos os dias, devido à depurinação espontânea do DNA, e que as bases nitrogenadas são suscetíveis à deaminação (LINDAHL, 1993). Agentes endógenos, como o metabolismo da mitocôndria e NADPH oxidases, geram espécies reativas de oxigênio como subproduto (JARUGA; DIZDAROGLU, 1996) e afetam o DNA e outras moléculas na célula, como lipídios de membrana. Esse processo de peroxidação lipídica da membrana é capaz de gerar outros compostos – aldeídos – também capazes de reagir com o DNA. Estima-se que mais de 20 mil lesões no DNA sejam induzidas de maneira endógena por dia em cada célula (FRIEDBERG, 2006). Além disso, diferentes agentes exógenos, físicos e químicos, podem interagir e causar alterações na estrutura do DNA, dentre os quais: luz ultravioleta (UV), radiação ionizante, conservantes de alimentos, poluição atmosférica, fumaça de cigarro e quimioterápicos (Fig. 1.3).

1.3 Luz UV e consequências dos fotoprodutos

A luz ultravioleta, por ser parte integrante da radiação solar, é o agente físico capaz de lesionar o DNA a que estamos mais expostos. A luz UV representa 45% de todo espectro solar, situa-se abaixo do comprimento de onda da luz visível e é subdividida didaticamente em três faixas de acordo com o comprimento de onda: UVA, com comprimento entre 320 e 400 nm; UVB, entre 280 e 320 nm e UVC, entre 100 e 280 nm. A camada de ozônio e a atmosfera terrestre absorvem toda luz UVC e grande parte de luz UVB (ROWLAND, 2006) e, assim, o que atinge a superfície terrestre é luz UVA e uma fração de luz UVB. Por apresentar maior comprimento de onda, luz UVA é menos energética e possui maior penetrância na pele quando comparado com luz UVB (Fig. 1.4A). Porém, mesmo atingindo somente a epiderme, a luz UVB é a maior responsável pelo efeito biológico nocivo de luz UV sobre as células por ser mais absorvida pelas moléculas de DNA (absorção máxima em 260 nm), causando 90% dos danos provocados por luz solar (WOOLLONS et al., 1997). Uma vez

absorvida, a luz UV induz reações nas bases do DNA, gerando lesões conhecidas como fotoprodutos de DNA. Estes promovem grandes distorções na estrutura do DNA, o que compromete mecanismos vitais para a célula por promover um bloqueio físico das maquinarias de replicação do DNA e transcrição de RNA (TORNALETTI, 2009).

Figura 1.3. A reatividade da molécula de DNA. Representação da dupla hélice de DNA com principais tipos de lesão (no lado esquerdo) e os respectivos agentes causadores das lesões (no lado direito).

Os fotoprodutos formados mais comuns são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Os CPDs resultam de ligação covalente entre pirimidinas adjacentes da mesma cadeia de DNA pela formação de um anel de ciclobutano nas posições C-5 e C-6, enquanto os 6-4PPs são resultado da ligação covalente não cíclica entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA, entre as posições C-6 e C-4, sem formação de anel (RASTOGI et al., 2010)(Fig. 1.4B). A proporção de fotoprodutos de DNA formados, tanto por luz UVC e UVB, é de 75% de CPD e 25% de 6-4PPs (KOBAYASHI et al., 2001; SCHUCH et al., 2009). Porém, enquanto CPD é formado de maneira aleatória na cromatina, 6-4PP apresentam diferente distribuição com formação preferencial em regiões entre nucleossomos (MITCHELL; NGUYEN; CLEAVER, 1990). Os 6-4PP apresentam maior distorção na dupla-hélice e, apesar de serem menos abundantes, são removidos mais rapidamente do que CPDs por mecanismos de reparo de DNA (COSTA et al., 2003). O

fotoproduto 6-4PP é praticamente todo removido em 6 h, enquanto que 50% de CPD ainda persiste 24 h após a irradiação com luz UV (KOBAYASHI et al., 2001). Assim, as duas lesões podem contribuir para induzir a morte celular, porém em células proficientes em reparo de DNA, o reparo rápido de 6-4PP faz com que CPDs contribuam mais com as complicações celulares (LIMA-BESSA et al., 2008).

Figura 1.4. Luz UV: indução de danos no DNA e transformação em mutações pontuais. **A)** A Luz UVC é barrada pela camada de ozônio de atmosfera terrestre. Da radiação solar que atinge a superfície, a porção de luz UVB possui menor penetrância em relação à luz UVA, devido ao menor comprimento de onda e maior energia. **B)** Os dois principais fotoprodutos induzidos pela absorção de luz UV pela molécula de DNA são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Estruturas moleculares foram adaptadas da revisão de Rastogi, et al 2010. **C)** A replicação de dímeros pode resultar em mutações pontuais. A mutação de citosina para timina é a mais comum após irradiação com luz UV e é chamada de assinatura de UV. Dois modelos explicam como isso poderia acontecer: A inserção sempre de adenina oposta a um dímero por polimerases TLS ou a replicação de uracila, resultado da desaminação da citosina no dímero.

A replicação de DNA lesionado pode resultar em mutação pontual por substituição de bases. A luz UV induz um padrão de mutações, conhecido como assinatura mutacional da luz UV, com a conversão de uma citosina (C) em uma timina (T) em sítios dipirímídicos (IKEHATA; ONO, 2011). Existem diferentes explicações para esse fenômeno. Polimerases com alta fidelidade são bloqueadas pelas lesões, mas as células dispõem de polimerases especializadas que conseguem transpor a lesão, porém com tendência maior de incorporar

erros. Essas polimerases tendem a adicionar adenina, independente da base na fita molde e assim, após duas rodadas de replicação, uma citosina pode ser convertida em uma timina (Fig. 1.4C). Foi observado também que CPD são induzidos em maior quantidade em 5-metilcitosina de sítios dipirimídicos. A citosina em um CPD é instável e facilmente sofre desaminação, se transformando em uracila (U). Porém, se uma 5-metilcitosina desaminar, esta será transformada em timina e mesmo uma replicação sem erros resultará em mutação, já que a citosina original foi convertida em timina e será colocada uma adenina na fita nascente (Fig. 1.4C). Dessa forma, se uma célula não remover as lesões antes de iniciar a replicação, mutações pontuais poderão ser formadas e contribuir para o processo de carcinogênese, aumentando o risco de câncer de pele após exposição à luz UV.

1.4 Dímeros durante a transcrição

A transcrição da informação do DNA é responsável por RNA e síntese de proteína que coordenam o metabolismo, sendo essencial para o funcionamento e sobrevivência celular. Diferente da replicação do DNA, nenhuma RNA polimerase especializa em transpor o bloqueio gerado pelos fotoprodutos foi descoberta e, dessa forma, outras estratégias devem ser utilizadas para continuar a transcrição durante todo o ciclo celular.

Foi visto na década de 80, em células de hamster, que o reparo de CPD é muito mais eficiente na fita transcrita do gene da diidrofolato redutase (*DHFR*) quando comparado a sequências de DNA ou genes não transcritos, levando à descoberta do reparo acoplado à transcrição (TCR – *transcription coupled repair*) (BOHR et al., 1985). Dessa forma, durante as fases G0/G1 e G2/M do ciclo celular – em que não ocorre a duplicação do genoma - o reparo de DNA é focado na porção do genoma em que existem complicações: genes ativos. Assim, a função do TCR é provavelmente remover obstruções para a RNA polimerase de maneira mais rápida, ao invés de somente reparar genes expressos, já que sinalização de morte por apoptose é induzida em células deficientes em que o bloqueio da transcrição é persistente (LJUNGMAN; ZHANG, 1996).

Algumas possibilidades podem acontecer com o bloqueio da RNA polimerase diante de uma lesão no DNA (HANAWALT; SPIVAK, 2008). Primeiramente, a lesão não pode ser acessada por enzimas de reparo para que seja feita a remoção devido ao bloqueio da RNA Polimerase (Fig. 1.5A) (TORNALETTI, 2009). Assim, uma possibilidade seria a síntese

translesão da transcrição, com a possível consequência de mutação no RNAm (Fig. 1.5B). Esse processo foi observado em levedura com baixa eficiência, mas foi relacionado à resistência celular frente a luz UV (WALMACQ et al., 2012). Uma segunda alternativa seria a regressão da RNA polimerase, criando espaço para o acesso de enzimas de reparo de DNA (Fig. 1.5C), fenômeno o qual foi observado *in vitro* (DONAHUE et al., 1994). Por fim, a terceira alternativa seria a remoção da RNA polimerase através de degradação (Fig. 1.5D), com evidências em células humanas de poliubiquitinação da subunidade maior da RNA polimerase II (RNAPII) e degradação por proteassomo após luz UV (RATNER et al., 1998). Dessa forma, o eficiente reparo acoplado à transcrição poderia remover a lesão e recuperar a síntese de RNA.

Figura 1.5. Possibilidades após bloqueio da RNA polimerase diante a uma lesão. A) Após encontrar uma lesão como dímero de pirimidina, a RNA Polimerase II fica bloqueada e impedindo acesso de outras proteínas à lesão. B) As polimerases poderiam conseguir transpor a lesão com baixa eficiência, porém o resultado seria mutação transcricional. C) As polimerases poderiam recuar e permitir acesso para enzimas de reparo de DNA. D) Se as polimerase não conseguem recuar, elas seriam poliubiquitinadas e degradadas via proteassomo, gerando espaço para que o reparo de DNA acontecesse.

1.5 Dímeros durante a replicação – Síntese Translesão e mecanismos alternativos

Mutação é a fonte de diversidade genética e juntamente com a seleção natural é a base de especiação e evolução biológica. No nível celular, entretanto, é um processo arriscado. Apesar de que mutações podem ser neutras ou vantajosas para a sobrevivência, grande parte será deletéria e poderá comprometer a homeostase celular e controle da divisão celular, podendo resultar em células tumorais. Durante a fase S, todo o genoma está vulnerável a bloqueios e complicações decorrentes de lesões no DNA. Bloqueio da replicação pode levar ao colapso da forquilha, quebras no DNA e instabilidade genômica através de aberrações cromossômicas, como translocações cromossômicas e aneuploidias. Dessa forma, a estabilização e recuperação de forquilhas de replicação bloqueadas – mesmo sem a remoção das lesões no DNA - são essenciais para a integridade genômica e podemos dividir as vias de tolerância ao dano no DNA em síntese translesão (TLS – *translesion synthesis*) e troca de fita molde (*Template Switch*) (CHANG; CIMPRICH, 2009).

As polimerases replicativas com alta fidelidade, como Pol α , Pol δ e Pol ϵ , pertencem à família B de DNA e encontramos em células de mamíferos 8 polimerases com sítios catalíticos mais abertos e capazes de realizar a síntese translesão. São quatro da família Y de DNA polimerases: Pol η (POLH), Pol ι (POLI), Pol κ (POLK) e REV1. Uma da família B de DNA polimerases : Pol ζ , cuja subunidade catalítica é REV3L . Duas da família A, com Pol θ (POLQ) e Pol ν (POLN) (GHOSAL; CHEN, 2013), além da recém-descoberta DNA primase e polimerase TLS designada de PrimPol (BIANCHI et al., 2013; MOURÓN et al., 2013). As polimerases TLS possuem especificidade diferente para distintos danos no DNA. Por exemplo, Pol η insere preferencialmente duas adeninas opostas a um CPD de timina (T[^]T), enquanto que Pol κ consegue transpor sem erros lesões em guanina induzidas por benzopireno. Polimerases TLS são consideradas propensas a erro de incorporação devido à maior frequência de erros em replicação de DNA não lesionado quando comparado às polimerases clássicas da família B (MCCULLOCH; KUNKEL, 2008), entretanto, dependendo da polimerase TLS recrutada, a lesão pode ser replicada praticamente sem erro como Pol η tendo CPD de timina-timina como molde (JOHNSON et al., 2000). A outra lesão gerada por luz UV, o dímero 6-4PP, possui uma distorção muito maior e não pode ser replicada por Pol η e estudos indicam que Pol ζ e REV1 são necessárias para transpor essa lesão (NAKAJIMA et al., 2004).

Figura 1.6. Modelos de Síntese Translesão. Após bloqueio da DNA polimerase com alta fidelidade, pode acontecer a troca para uma polimerase de síntese translesão (TLS) na forquilha bloqueada, mecanismo que envolve a monoubiquitinação de PCNA (lado esquerdo) ou seria deixado uma lacuna na fase S, a qual seria preenchida em outro momento por uma polimerase TLS (lado direito).

Existem dois modelos para explicar em que momento aconteceria a síntese translesão: Troca de polimerases na forquilha ou preenchimento de lacuna independente de fase S (Fig. 1.6). De acordo com o primeiro modelo, com o bloqueio da forquilha, haveria o recrutamento da polimerase TLS e PCNA (*P*roliferação *c*ell *n*uclear *a*ntigen) seria monoubiquitinado pelo complexo Rad6/Rad18 de modo a facilitar a troca e garantir a manutenção da polimerase TLS (DESPRAS et al., 2012). De acordo com o segundo modelo de preenchimento das lacunas, as forquilhas seriam reiniciadas (*re-priming* ou extensão de outra origem de replicação) após o bloqueio, deixando uma lacuna de DNA simples-fita

(ssDNA – *single stranded* DNA) aposta à lesão que é recoberta pelo heterotrímero RPA (*replication protein A*), de modo que a polimerase TLS seria responsável pelo preenchimento desta lacuna de modo desassociado da forquilha de duplicação do DNA (DAIGAKU; DAVIES; ULRICH, 2010; DIAMANT et al., 2012).

Muito menos é conhecido sobre a tolerância aos danos no DNA por troca de molde, em que temporariamente a fita molde é trocada para a cromátide-irmã não lesionada de modo que seja possível transpor a lesão e continuar a replicação (Fig. 1.7). Esse mecanismo com semelhanças com recombinação homóloga foi estudado em levedura, envolve Rad5, Ubc13 e Mms2 (BROOMFIELD; HRYCIW; XIAO, 2001) e seu controle envolve a poliubiquitinação de PCNA na lisina 63 (HOEGE et al., 2002). Diferentes modelos de vias alternativas de tolerância (que não envolvam polimerases TLS) tentam explicar a recuperação da forquilha de replicação bloqueada: poderia ocorrer a troca de fita molde tanto na lacuna deixada em fase S quanto na própria forquilha bloqueada, além de recuperação mediada por enzimas de recombinação homóloga quando acontece o colapso e quebra do DNA resultado em troca entre cromátides-irmã (Fig. 7)(AGUILERA; GÓMEZ-GONZÁLEZ, 2008; BRANZEI; FOIANI, 2007; CHANG; CIMPRICH, 2009). De qualquer forma, tanto síntese translesão e troca de fita molde possibilitam o recomeço da síntese de DNA e evitam desastres maiores de instabilidade genômica, apesar de deixarem a lesão para que o reparo aconteça posteriormente.

1.6 Removendo dímeros – Reparo por Excisão de Nucleotídeos

A remoção dos fotoprodutos, nos humanos, é realizada somente pela via de reparo de DNA denominada por reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* - NER). Esta via é flexível e versátil, pois reconhece diferentes lesões que promovem distorções na dupla hélice do DNA (NOUSPIKEL, 2009). Podemos dividir em NER em 2 subvias pela diferença no reconhecimento da lesão. O primeiro é o reparo acoplado à transcrição (*transcription coupled repair* - TCR-NER), o qual se restringe a danos em fitas ativamente transcritas devido ao bloqueio da RNA polimerase II e envolve as proteínas CSA, CSB e a recém-descoberta UVSSA. O segundo é o reparo do genoma global (*global genome repair* - GGR-NER), responsável pela remoção das lesões em regiões não transcritas do genoma, sendo o reconhecimento feito pelo complexo XPC-hHR23B e por DDB1-DDB2-CUL4A.

Figura 1.7. Mecanismos alternativos de tolerância a danos no DNA. Caso haja a indução de quebra na forquilha de replicação, proteínas de recombinação homóloga serão recrutadas e realizarão a troca entre cromátide irmãs para que a replicação possa continuar (lado esquerdo). Mesmo sem quebra, o DNA nascente bloqueado pode trocar de fita molde com a cromátide-irmã para continuar a síntese de DNA (centro). O mesmo pode acontecer em lacunas deixadas na fase S (lado direito).

Os caminhos subsequentes ao reconhecimento são iguais às duas vias e começa com a abertura da dupla hélice pelas helicases XPB e XPD, que fazem parte do complexo de transcrição TFIIH. Em seguida, as proteínas XPA e RPA se juntam para estabilizar o complexo e, no próximo passo, a endonuclease XPF cliva na extremidade 5' e a lacuna é preenchida pela polimerase replicativa, que utiliza como molde a fita complementar. Por fim, a endonuclease XPG cliva na extremidade 3', excisando o fragmento de aproximadamente 30 nucleotídeos e uma DNA ligase completa o reparo da lesão (Fig. 1.8) (HANAWALT; SPIVAK, 2008; KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012).

O reparo por excisão de nucleotídeos depende de mudanças na configuração da cromatina para que reconhecimento e excisão dos danos no DNA ocorram de maneira eficiente. O complexo DDB1-DDB2-CUL4A representam um dos elos descobertos entre o reparo global e modificações pós-traducionais de histonas. A via de NER é mais eficiente em DNA nu em comparação com DNA em cromatina (SUGASAWA; MASUTANI; HANAOKA, 1993)

e é mais lenta em regiões de heterocromatina (ARAKI et al., 2000), mostrando que, além de regiões transcritas, outras porções do genoma podem ter diferença na remoção de danos no DNA, o que demonstra a importância do remodelamento da cromatina para o funcionamento do reparo de DNA.

Figura 1.8. Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos. O reconhecimento da lesão pode acontecer de duas formas: Bloqueio da RNA polimerase ou reconhecimento global através dos complexos de XPC e DDB1 e DDB2. Essas etapas envolvem remodelamento da cromatina, com modificação em histona, para facilitar acesso à lesão. Em seguida TFIIH é recrutado e acontece a abertura da dupla-hélice e excisão da extremidade 5' por XPF-ERCC1. A síntese de novo de DNA acontece para preencher a lacuna e a extremidade 3' é excisada por XPG. Por fim, uma DNA ligase sela o DNA recém-sintetizado finalizando o reparo de DNA.

Figura 1.9. Sobrevivência de células com mutações proteínicas da via de reparo por excisão de nucleotídeos ou em síntese translesão, após irradiação com luz UVB. Células MRC5 são células selvagens e apresentam a menor sensibilidade à luz UVB. Células XP-V são deficientes em pol η (portanto, em TLS), mas proficientes em NER e são apenas um pouco mais sensíveis à luz UVB em relação a células selvagens. Já células XP-C, possuem deficiência somente no reconhecimento global de NER pela mutação na proteína XPC e são mais sensíveis do que XP-V, porém a maior sensibilidade é observada na célula XP-A, devido à deficiência nas duas subvias de NER.

Muitas proteínas de NER foram descobertas pela associação com algumas síndromes humanas raras com herança autossômica recessiva, dentre as quais se encontra xeroderma pigmentosum (XP). Pacientes XP apresentam elevada fotossensibilidade, um aumento de quase 1000 vezes na frequência de tumores de pele em regiões expostas à luz solar e nos olhos, além disso, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem anormalidades neurológicas. São descritos oito grupos de complementação para a síndrome XP: sete deles com mutações em genes cujos produtos proteicos estão diretamente envolvidos na cascata de NER (XP-A a XP-G) e um grupo variante (XP-V) com deficiência na polimerase TLS pol η (CLEAVER et al., 1999a). A sensibilidade de células de pacientes XP correlaciona com a participação diferentes proteínas na via de NER: célula de paciente XP-A (deficiente na proteína XPA) é a mais sensível à luz UVB, pois apresenta deficiência tanto da via global quanto da acoplada à transcrição, enquanto célula de paciente XP-C apresenta sensibilidade menor, já que a deficiência é só na via de reparo global. Célula de paciente XP-V não apresenta deficiência em NER, porém a deficiência na síntese translesão de pol η acarreta em uma ligeira sensibilidade (Fig. 1.9).

1.7 Diante de tantas ameaças: Sinalização e controle do Ciclo Celular

Células em proliferação estão em geral mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de danos no DNA do que células quiescentes. Isso se deve às complicações dramáticas que podem acontecer com a replicação de DNA lesionado e durante a segregação cromossômica com quebras no DNA (LJUNGMAN, 2010). Para evitar entrar em fase S ou em mitose com danos no DNA, as células ativam vias de resposta ao dano no DNA que promovem parada no ciclo celular, o qual resulta em mais tempo para que as enzimas de reparo de DNA limpem o genoma antes da síntese de DNA ou da segregação cromossômica (HARRISON; HABER, 2006).

Em resposta a danos causados por luz UV, a quinase ATR (*ataxia telangectasia and Rad3 related*) é ativada e catalisa a fosforilação de centenas de proteínas-alvo. Uma estrutura no DNA é comum a diversos processos induzidos por danos no DNA e o responsável por estimular a atividade de ATR: ssDNA recoberto de RPA (CIMPRICH; CORTEZ, 2008; ZOU; ELLEDGE, 2003). Células em fase G1 do ciclo celular geram ssDNA de 30 nucleotídeos como intermediário do processamento de NER e esta lacuna é estendida pela exonuclease Exo1 gerando ativação de ATR (GIANNATTASIO et al., 2010; HANASOGE; LJUNGMAN, 2007; LINDSEY-BOLTZ et al., 2014; SERTIC et al., 2011). Uma vez que o complexo com ATR estiver ativo na lesão do DNA, uma ampla variedade de substratos serão fosforilados, incluindo a Chk1 (*checkpoint kinase 1* - Chk1). Uma vez ativada, esta proteína efetora induz uma rápida degradação de Cdc25A (MAILAND, 2000), a qual inibe o complexo da Ciclina E/CDK2 (CDK2 - *cyclin-dependent kinase 2*) e é responsável pela transição entre G1/S. Além disso, o fator de transcrição p53 é fosforilado por ATR na serina 15, o que resulta em estabilização de p53 e aumento da transcrição de seus genes-alvo. Um alvo chave de p53 é a proteína p21, que atua como inibidor de Ciclina E/CDK2 e assim também promove parada do ciclo celular em G1 (KASTAN; BARTEK, 2004). Assim, Chk1-Cdc25A implementa uma resposta rápida e atrasa a transição G1/S em algumas horas, enquanto a prorrogação da parada em fase G1 é sustentada pelo mecanismo dependente de p53 (Fig. 1.10B). Em fase S, os fotoprodutos bloqueiam a maquinaria de replicação e isso gera desacoplamento entre a DNA polimerase e a helicase (BYUN et al., 2005), o qual resulta no sinal para a ativação de ATR - ssDNA recoberto por RPA - e fosforilação de Chk1, que em fase S resultará em inibição de novas origens de replicação (HEFFERNAN et al., 2002). Esse efeito é mais

visível em células deficientes na ativação do ponto de parada de G1 (como por exemplo, deficientes em p53) e na síntese translesão de pol η , já que mais ssDNA será formado por mais bloqueios de forquilha de replicação, resultando em acúmulo de células em fase S (Fig. 1.10D). Células com deficiência na ativação do ponto de parada de G1, mas com síntese translesão normal, progredirão à fase G2 onde tanto lacunas opostas aos fotoprodutos (CALLEGARI et al., 2010) quanto intermediários de NER ativarão ATR e resultarão em parada do ciclo celular em G2 (Fig. 1.10C).

Figura 1.10 - Resposta ao dano no DNA após luz UV: Integrando ciclo celular com tolerância e reparo de DNA. **A)** Fibroblasto normal de pele não irradiado tem progressão normal pelo ciclo celular. Ao centro, visualização do perfil de ciclo celular mostrando 2 picos, correspondendo a G₁ (em maior número por ser a fase da intérfase com maior tempo de duração) e G₂. **B)** Fibroblasto irradiado com luz UV tem ativação da quinase ATR e de p53, resultando em acúmulo de células em G₁ (ponto de parada em G₁). **C)** Fibroblasto transformado (Ex. SV-40) que não possui p53 ativo, dessa forma células irradiadas progridem com danos no DNA pelo ciclo celular através de síntese translesão, realizada principalmente por Pol η . Como lesões persistem, ativação de ATR provocará acúmulo de células em G₂, antes que células entrem em mitose ainda com danos (ponto de parada em G₂/M). **D)** Fibroblasto imortalizado (Ex. SV-40) que não possui p53 ativo e é deficiente em Pol η (células XP-V) possui bloqueio da replicação após irradiação com luz UV pela deficiência na síntese translesão. Dessa forma, ATR é ativado em fase S, provoca acúmulo de células nesta fase do ciclo (checkpoint intra-S) e resulta em maior morte celular, visualizado ao centro pelo aumento de células com conteúdo sub-G₁ de DNA.

1.8 ATM e ATR: os controladores de desastres no DNA

A quinase ATR pertence à família de fosfoinositideo-3-quinases (PIKK) que inclui também as proteínas quinases ATM (*ataxia telangectasia mutated*) e DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Essas quinases fosforilam preferencialmente resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr), seguidos de glicina (Gln), e são proteínas centrais na sinalização em resposta a dano no DNA, apresentando grande sobreposição de alvos. Enquanto que ATR é ativada por ssDNA recoberto por RPA, as quinases ATM e DNA-PK respondem principalmente a lesões de duplas quebras no DNA (DSB – *double strand breaks*), porém já foi descrita ativação direta através de oxidação de ATM devido a peróxido de hidrogênio, independente de quebras (GUO et al., 2010). A ativação dessas quinases depende do recrutamento mediado por outras proteínas parceiras: o recrutamento de ATR para ssDNA exige ATRIP (ZOU; ELLEDGE, 2003), o recrutamento da subunidade catalítica de DNA-PK a DSB é mediado pelo heterodímero Ku70-Ku80 (GOTTLIEB; JACKSON, 1993), ao passo que o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) relaciona-se ao recrutamento de ATM às lesões DSB (ANDEGEKO et al., 2001). Os alvos de fosforilação dessas quinases são extremamente diversos e demonstram uma resposta celular ampla, muito além de somente paradas no ciclo celular (Fig. 1.11). O fosforiloma de ATM e ATR revelou 570 alvos de fosforilação após irradiação com luz UV, sendo 498 nunca antes descritos (STOKES et al., 2007). Entre esses alvos, muitos alvos envolvidos com a replicação do DNA (MCMs, RPA, RFC, TopBP1 e DNA polimerases como pol η), reforçando um papel importante no controle de origem de replicação, estabilidade da forquilha e recuperação da replicação, além de muitos alvos relacionados a reparo de DNA como XPA (envolvida em NER), FANCD2 (envolvida em reparo de *cross-link*) e BRCA1, 53BP1, WRN e BLM (envolvidas em recombinação homóloga). Porém, é mais impressionante o grande número de alvos em outras vias como diferenciação celular, desenvolvimento, sistema ubiquitina e proteassomo, processamento de RNA e reguladores transcricionais, matriz nuclear, remodelamento de cromatina e ritmo circadiano. De fato o maior grupo fosforilado por ATR é um grupo de proteínas envolvidas em metabolismo de RNA - transcrição, *splicing*, estabilidade de RNAm - além de tradução de mRNAs.

Figura 1.11. Danos no DNA resultam em uma ampla resposta celular para diminuir a instabilidade genômica e tumorigênese. O reconhecimento da lesão ativa uma cascata de sinalização que resulta em respostas rápidas, como modificação pós-traducional de proteínas existentes, remodelamento da cromatina e alteração da arquitetura nuclear; além de respostas celulares mais demoradas, como modulação da expressão gênica com alteração da estabilidade de RNAm, *splicing* e síntese de genes alvos, incluindo processos como ciclo celular, reparo de DNA, mecanismos de tolerância e até ritmo circadiano. Caso a recuperação não seja possível, a resposta pode ainda induzir senescência ou a morte celular por apoptose de modo que diminua a chance da instabilidade genômica provocada pelos danos no DNA originar em uma célula tumoral.

O nocaute de ATR em modelos animais resulta em letalidade embrionária (BROWN; BALTIMORE, 2000). Porém, através de modelos com nocaute condicional - eliminando ATR somente no animal adulto – ou com mutação em heterozigose foi possível constatar que a vida é muito estressante sem ATR, mesmo sem lesões exógenas. Com o modelo heterozigoto foi observado aumento de estresse replicacional durante a embriogênese – fase quando a proliferação é muito difundida - com aumento da fosforilação da histona H2AX e aumento de morte de células resultando em deformações (MURGA et al., 2009). Com o nocaute condicional foi observado envelhecimento precoce no indivíduo adulto – pêlos cinzas, osteoporose, cifose e fibrose – devido à perda de homeostase tecidual relacionada à incapacidade de renovação celular provocada pela redução de células tronco e progenitoras (RUZANKINA et al., 2007). Assim, a função de ATR não é somente relacionada a resposta a danos no DNA causados por luz UV, mas também para responder a qualquer complicação durante a replicação. Regiões do genoma – mesmo sem danos externos - podem ser obstáculos à progressão da forquilha, como regiões altamente repetitivas que podem formar

grampos e bloquear a replicação (WELLS, 1996) ou colisões entre transcrição e replicação, principalmente em genes longos (HELMRICH; BALLARINO; TORA, 2011). De fato, ATR é responsável por evitar quebras através da regulação de sítios frágeis (CASPER et al., 2002), em que são encontradas repetições CGG e AT, além de estruturas não-canônicas de DNA diferentes de DNA-B (AGUILERA; GÓMEZ-GONZÁLEZ, 2008).

1.9 Síndromes relacionadas a defeitos em vias de reparo de DNA

A importância das respostas ao dano no DNA na fisiologia humana é exemplificada por diversas síndromes humanas causadas por mutações nessas vias. Os fenótipos variam de anormalidades neurológicas, envelhecimento precoce a predisposição a câncer. As principais síndromes, incluindo respectiva predisposição a câncer, estão resumidas na revisão de (GHOSAL; CHEN, 2013) e adaptadas na tabela 1.1.

Existem diferentes síndromes com deficiências em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos: Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne (CS), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome sensível a UV (UV^SS) (CLEAVER; LAM; REVET, 2009; MENCK; MUNFORD, 2014; NAKAZAWA et al., 2012). Pacientes XP apresentam elevada fotossensibilidade e a idade mediana de aparecimento de câncer de pele é antes dos 10 anos de idade, sendo que 30% dos pacientes apresentam também neurodegeneração. Mutações em *XPC* e *DDB2* (*XPE*) são as principais formas de XP sem problemas neurológicos. Ambos participam do reconhecimento da lesão na subvia de reparo global de excisão de nucleotídeos. Deficiências somente na subvia de reparo acoplado à transcrição não aumentam o risco de câncer. Pacientes CS apresentam sintomas neurológicos e de desenvolvimento graves e apesar da fotossensibilidade, não apresentam risco maior de câncer de pele. Cérebros de pacientes CS apresentam grande quantidade de lesões por oxidação e evidências mostram que CSB é importante para o funcionamento da mitocôndria e, assim, parte do fenótipo da síndrome de Cockayne poderia estar relacionada à mitocôndria (BERQUIST et al., 2012) ou a outras funções de CSA e CSB relacionados à transcrição e remodelamento de cromatina. A síndrome UV^SS também apresenta fotossensibilidade, porém, diferente de pacientes CS, não apresentam problemas neurológicos. A proteína mutada UVSSA atua em resposta a luz UV, mas não a danos por estresse oxidativo (SPIVAK; HANAWALT, 2006), diferente de CSB, o que pode ajudar a explicar os diferentes fenótipos (Tabela 1). Deficiências na transcrição

também parece ser a principal causa da síndrome TTD – caracterizada por cabelo quebradiço e deficiente em enxofre - em que a falta do fator de transcrição TFIIH prejudica a síntese de RNA em grande quantidade em células diferenciadas como cabelo, unha e células imunes (CLEAVER; LAM; REVET, 2009). Assim, a pleiotropia de funções das proteínas, com funções além de reparo de DNA, pode auxiliar a explicar as variações de fenótipo.

Existem ainda síndromes com deficiência em outras vias de reparo de DNA ou na sinalização em resposta a dano. Defeitos na via de reparo de emparelhamento errôneo resultam na síndrome de Lynch, caracterizado principalmente pelo aumento de câncer colorectal. Mutações em *BRCA1* e *BRCA2* resultam em câncer hereditário de mama e ovário. Deficiências em genes envolvidos em recombinação homóloga também resultam nas síndromes de Werner, Bloom e Rothmund Thomson, com fenótipo de envelhecimento precoce e aumento de linfomas e sarcomas. Mutação em *ATM* é causa da ataxia telangiectasia, doença neurológica que possui maior incidência de leucemias. Mutação em heterozigose de *ATR* resulta na síndrome de Seckel que, assim como nos modelos em camundongo, apresenta problemas de desenvolvimento como microcefalia e envelhecimento precoce, tendo também relatos de aumento de leucemia. Outra doença que aumenta a incidência de leucemia é anemia Fanconi, com mutações em diversos genes da via de reparo de *cross-links*. Mutações em p53 dão origem à síndrome de Li-Fraumeni, também caracterizada por maior risco de câncer em diversos órgãos (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Resumo das principais síndromes causadas por mutações em vias de resposta ao dano no DNA e sua predisposição à tumorigênese. Adaptado de Ghosal e Chen (2013).

Síndrome	Mutações	Predisposição a câncer	Via afetada
Xeroderma Pigmentosum	XPA; XPB; XPC; XPD; XPE; XPF; XPG ou POLH	Câncer de pele	NER ou TLS
Síndrome de Cockayne	CSA ; CSB ; XPB; XPD; XPG		
Tricotiodistrofia	XPD; XPB; TTDA		TCR-NER
Síndrome sensível a UV	UVSSA		
Anemia Fanconi	FANCA; FANCB; FANCC; BRCA2; FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG; FANCI; BACH1; FANCL; SLX4	Leucemia mielóide aguda	Reparo de ICL; recombinação homóloga
Síndrome de Li-Fraumeni	p53	Câncer de mama; cérebro; leucemia e sarcoma	Sinalização em resposta a dano no DNA
Síndrome de Seckel	ATR	Leucemia mielóide aguda	Sinalização em resposta a dano no DNA
Ataxia Telangiectasia	ATM	Leucemia; linfoma; câncer de mama	Sinalização em resposta a dano no DNA
Câncer de mama familiar	BRCA1 BRCA2	Câncer de mama e ovário	
Síndrome de Bloom	BLM	Linfoma e leucemia	
Síndrome de Werner	WRN	Sarcoma	Recombinação homóloga
Síndrome de Rothmund Thomson	RECQL4	Câncer de pele e osteosarcoma	
Síndrome de Lynch	MSH2; MLH1; MSH6; PMS2;	Câncer colorretal; estômago; intestino; endométrio; glioblastoma	Reparo de emparelhamento errôneo

Instabilidade genômica e câncer: Como potencializar terapia antitumoral?

As divisões celulares são fortemente reguladas em tecidos normais e resultam na prevenção de transformação neoplástica. A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, em que a progressão depende em uma acumulação sequencial de mutações em uma mesma célula, que em geral acontece após eventos de replicação. Essas mutações resultam em perda da homeostase tecidual já que as células transformadas adquirem vantagens seletivas pelo aumento da taxa de proliferação, diminuição da indução de morte celular, além da criação de um microambiente propenso ao crescimento (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A forma mais comum de modular o ciclo celular e combater a progressão tumoral é explorar o efeito de drogas que lesionem o DNA. Paradas no ciclo celular e morte ocorrem após exposição a danos no DNA, principalmente durante a replicação do DNA na fase S. Tentativas de replicar DNA lesionado levam ao aumento de morte celular e tornam tratamento que lesionem o DNA mais citotóxico em células em proliferação quando comparadas com células quiescentes ou diferenciadas (HELLEDAY et al., 2008). Entretanto, a toxicidade pode ser reduzida pela superativação de vias de reparo de DNA, o que torna a resposta ao dano no DNA um alvo de intervenção terapêutico promissor. Além de poder reverter a resistência de terapias atuais, pode resultar em mortalidade seletiva das células tumorais (CURTIN, 2012). Assim, um entendimento da resposta ao dano no DNA não só contribuirá com o conhecimento de desenvolvimento de câncer, mas também para o tratamento da doença.

1.10 Objetivo da Tese:

- (I) Explorar a contribuição da sinalização da quinase ATR em vias de tolerância e de reparo de DNA em resposta ao dano no DNA causado por luz UVB em fibroblastos humanos;
- (II) Investigar a depleção de ATR como alvo terapêutico para potencializar quimioterápicos no tratamento anticâncer em linhagens tumorais humanas;
- (III) Compreender a resposta celular frente ao bloqueio da transcrição provocada por danos no DNA após irradiação com luz UVC e comparar a recuperação da síntese de RNA individual de genes em escala genômica em fibroblastos humanos

CAPÍTULO 2 :

COMO CÉLULAS LIDAM COM DANOS NO DNA INDUZIDOS POR LUZ ULTRAVIOLETA B DURANTE A REPLICAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

A luz ultravioleta danifica o DNA através da indução de dímeros de pirimidina (BEUKERS; BERENDS, 1960), os quais bloqueiam polimerases replicativas de alta fidelidade (KANAZIR; ERRERA, 1954). As células evitam o bloqueio da forquilha de replicação removendo os fotoprodutos através do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) ou através da troca para uma polimerase especializada para efetuar a síntese translesão. Defeitos em qualquer dessas vias resultam na rara síndrome hereditária conhecida como Xeroderma Pigmentosum, caracterizada por extrema sensibilidade ao sol e risco aumentado de câncer de pele. Enquanto os sete grupos de complementação clássicos (XP-A a XP-G) exibem mutações em NER, o grupo variante (XP-V) é decorrência de mutações na DNA polimerase translesão η (DIGIOVANNA; KRAEMER, 2012; MENCK; MUNFORD, 2014).

Apesar da proficiência de reparo de DNA, células de pacientes XP-V exibem mutagênese aumentada após irradiação com luz UV (WANG et al., 1993) e lenta recuperação da síntese de DNA, a qual é ainda mais afetada após tratamento com cafeína (CLEAVER; THOMAS; PARK, 1979). Células primárias são ligeiramente sensibilizadas por luz UV após cafeína, entretanto, após a inativação da proteína p53 – tanto por immortalização por SV40 ou genes de HPV – a sensibilização aumenta dramaticamente (CLEAVER et al., 1999b). A perda do ponto de checagem G1/S induzido por danos no DNA é uma característica comum em células tumorais e facilita a instabilidade genômica (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), uma vez que promove a replicação na presença de danos no DNA. Assim, células imortalizadas com SV40 dependem ainda mais da DNA polimerase η para realizar a síntese translesão, já que células XP-V SV40 exibem maior assimetria na forquilha de replicação (DESPRAS et al., 2010), maior ativação da quinase ATR (BOMGARDEN et al., 2006) e trocas entre cromátides irmãs (CLEAVER et al., 1999b), como vias alternativas para recuperar a síntese de DNA após luz UV.

A quinase ATR atua como regulador da resposta ao dano causado por luz UV e controla a progressão do ciclo celular, reparo e replicação do DNA (CIMPRICH; CORTEZ, 2008). A ativação inicia com a ligação de proteínas RPA (*replication protein A*) a DNA simples-

fita (*ssDNA* – *single strand DNA*), um sinal proveniente de reparo e replicação de DNA. Assim, danos induzido por luz UV ativam ATR em todas fases do ciclo celular através de intermediários de NER (HANASOGE et al., 2007), ou durante a fase S por forquilhas de replicação bloqueadas, como consequência de desacoplamento da DNA polimerase e helicase. A resposta ao dano no DNA mediada por ATR envolve ao menos 570 alvos de fosforilação (STOKES et al., 2007), incluindo proteínas de reparo de DNA (XPA), recombinação (BRCA1, WRN e BLM) e efetores do ponto de checagem, como Chk1, que irá contribuir a estabilizar forquilhas de replicação, inibir novas origens de replicação e induzir parada do ciclo em G2/M (CIMPRICH; CORTEZ, 2008). Recentemente, foi visto que a inibição de ATR ativa origens de replicação e - diante de estresse de replicação – esgota RPA disponível na célula gerando colapso da forquilha e quebras no DNA, resultando em sinalização para a morte (TOLEDO et al., 2013).

O mesmo sinal que ativa o ponto de parada mediado por ATR – *ssDNA* – também ativa recrutamento de polimerases de síntese translesão através da monoubiquitinação de PCNA (CHANG; CIMPRICH, 2009). Entretanto, ainda não é claro se esses processos são independentes e se a síntese translesão exige ponto de parada em fase S, já que ATR é dispensável para a ubiquitinação de PCNA (NIIMI et al., 2008). Poderíamos esperar que a depleção de ATR resultasse em maior sensibilidade em células irradiadas com luz UV e que elas estariam mais suscetíveis a catástrofe mitótica pela perda dos pontos de checagem em resposta a dano no DNA (NGHIEM et al., 2001). Assim, se síntese translesão depende da sinalização de ATR, células proficientes em TLS apresentariam mesmas consequências que células XP-V após depleção de ATR. Assim, nosso objetivo foi investigar papéis específicos de ATR no controle do ciclo celular após irradiação com luz UVB – componente biológico mais relevante da luz solar - e sua contribuição para a síntese translesão. Para isso, ao invés de inibidores inespecíficos, nós depletamos a quinase ATR – usando siRNA – em fibroblastos humanos imortalizados por SV40 proficientes em TLS e NER, além de fibroblastos de pacientes XP-V ou XP-C para avaliar o impacto de ATR em células com diferentes fundo genéticos referente a respostas ao dano no DNA.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 A redução da quinase ATR sensibiliza fibroblastos imortalizados com SV40 à luz UVB

Utilizamos a interferência por RNA mediada por pequenos RNAs (siRNA) para depletar ATR e estudar as respostas celulares ao dano causado por luz UVB. A transfecção dos RNAs foi realizada com oligofectamina e em teste, com um RNA acoplado à molécula fluorescente Cy3, verificamos 99% de eficiência após duas transfecções em dois dias seguidos (Fig. 2.1A). Testamos nosso protocolo com três sequências de siRNA desenhadas para ter ATR como alvo (siATR) e em 2 dessas sequências, conseguimos visualizar redução dos níveis de RNAm (Fig. 2.1B) e de proteína (Fig. 2.1C) 72 h após a primeira transfecção. Assim, selecionamos a sequência com o silenciamento mais eficiente 72 h após a primeira transfecção: sequência I (RNAm reduzido a 20% e proteína reduzido a 30% em comparação com sequência controle - siCtrl). Essa redução da proteína ATR continua até 96 h após a primeira transfecção (Fig. 2.1D), o que garante que os níveis de ATR não retornarão ao longo dos experimentos. Por ATR ter função associada à replicação, testamos se o siATR afetaria o crescimento das células silenciadas e verificamos que não existe diferença entre 72 h e 120 h após a primeira transfecção (Fig. 2.1E).

Para avaliar se a deficiência em ATR afeta a sensibilidade de fibroblastos à luz UVB, medimos a sobrevivência clonogênica, a qual detecta células que escapam de todos os tipos de morte celular e senescência. Após o silenciamento de ATR, tanto as células selvagens (MRC5), como a deficiente em pol η (XP-V) ou XPC (XP-C) tornaram-se mais sensíveis à luz UVB (Fig. 2.2A). Entretanto, a depleção de ATR afetou principalmente células XP-V, as quais sobreviveram menos inclusive na menor dose testada.

Apesar de que, em curto prazo, o crescimento celular não foi afetado por siATR, observamos na sobrevivência clonogênica, um número de colônias inferior ao controle nas células silenciadas com siATR, mesmo quando não irradiadas (14 dias após a irradiação). Esse fato sugere que, em longo prazo, a depleção de ATR afeta a replicação mesmo sem danos exógenos ao DNA.

Figura 2.1. Padronização do silenciamento de ATR por siRNA. A) Transfecção com o reagente oligofectamina de RNAs dupla-fita conjugados com fluoróforo Cy3, indicando 99% de células positivas após nosso protocolo. B) PCR quantitativo em tempo real de células XP-V após transfecção com duas sequências diferentes de siRNA tendo como alvo a quinase ATR (siATR) ou uma sequência controle (siCtrl), para verificar a quantidade de mRNA restante após a depleção. A partir de então, a apenas a sequência com o melhor resultado (siATR I) foi usada. C) Western Blot de células XP-V com depleção da quinase ATR para verificar a eficiência do siRNA 72 h após a primeira transfecção. D) Cinética da quantidade de proteína ATR após silenciamento com siATR I. E) Curva de crescimento de células com depleção em ATR, mostrando que até 120 h após transfecção não observamos diferenças na proliferação. F) Esquema representando nosso protocolo de depleção de ATR por siRNA para os próximos experimentos.

2.2.2 ATR reprime ativação precoce de caspase-3 após luz UVB

Para avaliar mais especificamente como acontece essa maior sensibilidade, quantificamos a população sub-G1, que detecta fragmentação do DNA, uma etapa tardia de apoptose. Novamente, após silenciamento de ATR, todas linhagens tornaram-se mais sensíveis, principalmente células XP-V com a dose mais baixa de luz UVB 48 h após a irradiação (hpi – *hours post irradiation*) (Fig. 2.2B).

Figura 2.2. A depleção da quinase ATR sensibiliza fibroblastos imortalizados com SV40 à luz UVB. Células foram transfectadas com 40 nM de siRNA controle (siCtrl) ou tendo ATR como alvo (siATR) e irradiados com luz UVB 72 h após a transfecção. **A)** Sobrevivência clonogênica de MRC5-SV40 (selvagem), XP-V (XP30RO-SV40) ou XP-C (XP4PA-SV40) 10 dias após a irradiação com luz UVB (N=2). **B)** Quantificação da população subG1 para estimar a morte celular 48 h após irradiação com luz UVB (N=3). Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Então, para confirmar o papel protetor de ATR em relação à indução de apoptose após luz UVB, nós quantificamos caspase-3 ativada – uma caspase efetora - em nossas células silenciadas em ATR por imunofluorescência em citometria. Dessa forma, é possível marcar o DNA ao mesmo tempo e comparar a distribuição da proteína alvo, no caso Caspase-3, em função do ciclo celular. Depleção de ATR aumentou a ativação da caspase-3 nas três linhagens testadas, entretanto o aumento foi detectado precocemente para XPC e XP-V (24 hpi), mas somente 48 hpi para a linhagem selvagem MRC5 (Fig. 2.3A). A indução reflete em ativação dessa caspase efetora em fase S e em G2/M (Fig. 2.3B).

2.2.3 Depleção de ATR aumenta marcação pan-nuclear em fase S de γ H2AX após baixas doses de UVB em células XP-C e XP-V

Bloqueio da replicação após luz UV induz fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ H2AX) e em células imortalizadas com o antígeno T do vírus símio 40 (SV40 - *Simian virus 40*) – principalmente células XP-V - é aumentada ainda mais (LAPOSA et al., 2007; LIMOLI; LAPOSA; CLEAVER, 2002). Considerando o papel de ATR na forquilha de replicação e a indução de caspase-3, nós quantificamos γ H2AX em função do ciclo celular após luz UVB para avaliar se a sensibilidade está relacionada ao estresse replicacional.

Figura 2.3. ATR reprime ativação precoce de caspase-3 após luz UVB. Células foram transfectadas com 40 nM de siRNA controle (siCtrl) ou tendo ATR como alvo (siATR) e irradiados com luz UVB 72 h após a transfecção. **A)** Imunofluorescência em citometria, com a média total de fluorescência para caspase-3 ativada, 24 h (esquerda) ou 48 h (direita) após a irradiação com luz UVB (N=2). **B)** Distribuição de caspase-3 atividade em função do ciclo celular, indicando porcentagem de células positivas para caspase-3 no eixo Y (dot plots – gráficos superiores), além de histogramas de ciclo celular com marcação da quantidade de DNA no eixo X (histogramas - gráficos inferiores) e representação das células positivas em preto, nas mesmas amostras dos gráficos superiores. Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Para XP-C e XP-V, a fosforilação de H2AX aumentou 6 hpi em células deficientes em ATR após irradiação com luz UVB, exceto para 600 J/m^2 em XP-V em que parece haver saturação dos níveis de fosforilação dessa histona, associado ao fato da predominância de células em fase S estarem com marcação positiva para γ H2AX. Para a linhagem selvagem, o aumento após depleção de ATR foi observado principalmente após a maior dose (1200 J/m^2) (Fig 2.4A). Pelo fato da linhagem XP-C ser mais sensível à luz UVB, nós irradiamos somente até 200 J/m^2 para que a indução de morte fosse similar às outras linhagens.

Análise do ciclo celular revela que as células com marcação positiva para γ H2AX (fluorescência maior que o respectivo controle não irradiado) se encontram principalmente em fase S (Fig. 2.4B). Quando analisamos γ H2AX por microscopia, vemos que o silenciamento de ATR intensifica uma marcação pan-nuclear (Fig 2.4C), distinta da marcação *foci* descrita classicamente para radiação ionizante (ROGAKOU et al., 1998). Assim, a indução

reflete marcação por todo núcleo em células em replicação e corrobora que ATR protege a célula contra estresse de replicação causado por luz UVB. Mutações em síntese translesão ou reparo por excisão de nucleotídeos levarão a mais bloqueio da DNA polimerase frente a dímeros de pirimidina e dependerão de uma resposta ao dano dependente em ATR, mesmo após doses baixas de UVB. Além da marcação em fase S, é possível observar células positivas para γ H2AX em fase G2/M (diferente da fase G1), o que sugere a permanência da sinalização em resposta ao dano causado por luz UVB nas células que progridem no ciclo celular.

2.2.4 ATR promove a recuperação da replicação e ativa parada do ciclo celular na fase G2 em células imortalizadas por SV40, após irradiação com luz UVB

Células imortalizadas com SV40 são deficientes no ponto de checagem da fase G1 e, por isso, progridem à replicação mesmo na presença de lesões no DNA. Após irradiação com luz UVB, ATR ativa os pontos de checagem dentro da fase S e em G2/M (CIMPRICH; CORTEZ, 2008). Com o silenciamento de ATR, nós esperaríamos a perda dos pontos de checagem e que as células entrassem em mitose mesmo na presença de lesões no DNA. Desse modo, nós analisamos o ciclo celular de células silenciadas em ATR para acompanhar a consequência do estresse de replicação.

Nas primeiras 24 hpi, todas as linhagens testadas acumularam em fase S, entretanto, após 48 hpi, as linhagens proficientes em ATR superaram o estresse de replicação e acumularam nas fases G2/M, indicando ativação do ponto de checagem em G2 (Fig. 2.5A, painéis superiores). Notamos que as células XP-V tiveram maior dificuldade durante a replicação frente aos danos no DNA, ainda acumulando parcela das células em fase S na maior dose testada (600 J/m^2), mesmo tendo 48 h para recuperar, que condiz com sua deficiência em síntese translesão frente à irradiação com luz UV. Todas as linhagens deficientes em ATR apresentaram perfis de ciclo celular 24 hpi similares aos respectivos controles, entretanto, essas células foram incapazes de recuperar 48 hpi e continuaram com perfil similar ao de 24 hpi (Fig. 16A painéis inferiores), incluindo acúmulo em fase S (Fig. 2.5B). Esse efeito, novamente, foi mais proeminente na linhagem XP-V, mesmo na menor dose testada, enquanto que para a linhagem selvagem MRC5, o bloqueio em fase S em células depletadas é evidente em doses maiores.

Figura 2.4. Depleção de ATR aumenta marcação pan-nuclear em fase S de γ H2AX. Células foram transfectadas com 40 nM de siRNA controle (siCtrl) ou tendo ATR como alvo (siATR) e irradiados com luz UVB 72 h após a transfecção. **A)** Imunofluorescência em citometria, apresentando a média total de fluorescência para γ H2AX, 6 h após irradiação com luz UVB (gráficos do lado esquerdo) e distribuição de γ H2AX em função do ciclo celular, com marcação da quantidade de DNA no eixo X e de γ H2AX no eixo Y, indicando porcentagem de células positivas (dot plots do lado direito) (N=3). Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **B)** Imunofluorescência em microscopia, com marcação no núcleo célula com DAPI em azul e de γ H2AX em verde (N=2).

Figura 2.5. ATR promove a recuperação da replicação e ativa parada do ciclo celular na fase G2 em células imortalizadas por SV40, após irradiação com luz UVB. Células foram transfectadas com 40 nM de siRNA controle (siCtrl) ou tendo ATR como alvo (siATR) e irradiados com luz UVB 72 h após a transfecção. **A)** Histogramas representativos de três experimentos independentes apresentando com o conteúdo de DNA no eixo X, de células proficientes me ATR (gráficos superiores) ou com silenciamento de ATR (gráficos inferiores). **B)** Quantificação da porcentagem das fases do ciclo celular dos histogramas de A, utilizando o software ModFit.

2.2.5 Células humanas deficientes em ATR são incapazes de finalizar replicação após irradiação com luz UVB

Células silenciadas em ATR acumulam em fase S após irradiação luz UVB, independente da proficiência ou não de reparo de DNA e síntese translesão. Para investigar se as células realmente não chegam a entrar em mitose e morrem por uma eventual catástrofe mitótica devido à perda do ponto de checagem de danos no DNA, nós bloqueamos as células com nocodazol – um conhecido inibidor do fuso mitótico – para acumular células em metáfase.

Todas as células não irradiadas acumularam em G2/M após tratamento com nocodazol, seja pelas primeiras 24 h (Fig. 17A, painéis superiores, 0-24 h) ou nas últimas 24 h (Fig. 2.6A, painéis inferiores, 24-48 h). Após irradiação com luz UVB, células proficientes em ATR ainda acumularam em fase S após 24 hpi, mas em 48 hpi, elas acumularam em G2/M,

indicando recuperação dos danos e progressão pela fase S. Entretanto, as células deficientes em ATR não acumularam em G2/M após 48 hpi, pois mantiveram bloqueio em fase S encontrado já 24 hpi (Fig. 2.6A). Assim, células com deficiência em ATR não são capazes de recuperar do bloqueio da replicação, mesmo as selvagens (proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos e síntese translesão).

Figura 12. Fibroblastos com depleção de ATR iniciam síntese de DNA, mas são incapazes de alcançar mitose após irradiação com luz. Células foram transfectadas com 40 nM de siRNA controle (siCtrl) ou tendo ATR como alvo (siATR) e irradiados com luz UVB 72 h após a transfecção. **A)** O inibidor de fuso mitótico Nocodazol (100 ng/mL) foi adicionado logo após irradiação UVB e incubado por 24 h (0-24 h) ou adicionado 24 h depois da irradiação com luz UVB e incubado até coleta das células (24-48 h). **B)** O análogo de timidina BrdU (10 µM) foi adicionado 30 min antes da coleta (24 ou 48h após UVB) para marcar o DNA nascente. Dot Plot mostra BrdU (eixo Y) dentro das fases do ciclo celular (conteúdo de DNA no eixo X) e a porcentagem de células positivas para BrdU (em preto) (N=2).

Será que as células sem ATR tentam replicar o DNA lesionado e não conseguem ou, então, existe um bloqueio antes disso que impede essas células de replicarem? Para

responder essa pergunta, nós marcamos as células com BrdU - um análogo de timidina – por 30 min, após 24 ou 48 hpi. Todas as linhagens deficientes em ATR incorporam BrdU 24 hpi, sendo a porcentagem de células maior em células selvagens, onde marcação foi mais heterogênea e concentrada no começo da fase S (Fig. 2.6B). Após 48 hpi, as células silenciadas mantêm a redução da incorporação (Fig. 2.6B), porém a porcentagem de células positivas com siATR é próxima ao controle, o que sugere que as células iniciaram a replicação com danos, não conseguiram lidar com o bloqueio, mas ainda continuam tentando replicar o DNA. Esses danos corroboram que siATR sensibiliza por afetar a recuperação da fase S e que as células morrem antes de chegar na mitose, mesmo as proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos e síntese translesão.

2.2.6 Cafeína: O efeito de um inibidor seria o mesmo do que o do silenciamento de ATR?

Uma característica das células de pacientes XP-V é que fibroblastos primários são levemente sensibilizados por cafeína após irradiação com luz UV (ARLETT; HARCOURT; BROUGHTON, 1975), mas o grau de sensibilização aumenta de maneira marcante quando estas células são transformadas com SV40, mas não com proteínas do vírus do papiloma humano (HPV – *human papillomavirus*) do tipo HPV16 (E6/E7), a qual já é altamente sensível mesmo sem cafeína (CLEAVER et al., 2002). A diferença está no modo de alterar p53, em que SV40 se liga e inibe p53, mas o mantém estável, enquanto XPV-HPV16 (E6/E7) induz degradação de p53 por proteassomo. O poder da cafeína após UV foi relacionado à capacidade de induzir mitose antes da replicação estar completa (SCHLEGEL; PARDEE, 1986) e de inibir o ponto de checagem de G2, sendo que células p53^{-/-} eram mais afetadas (RUSSELL et al., 1995). Em 1999, constatou-se que cafeína é capaz de inibir, *in vitro*, quinases da família PIKK, sendo inibidor de ATR (IC₅₀=1,1 mM) e também de ATM (IC₅₀=0,2 mM) (SARKARIA et al., 1999). Porém, além de ter outros efeitos nas células, existe a controvérsia de que seu efeito *in vivo* sobre o ciclo celular não se dá pela inibição das quinases ATM e ATR (CORTEZ, 2003).

Quando inibimos células XP-V com 1 mM de cafeína, a sensibilidade à luz UVB aumenta de modo que a sobrevivência clonogênica se assemelha a de uma linhagem XP-A (deficiente nas duas subvias do reparo por excisão de nucleotídeo) (Fig. 2.7A). Essa sensibilidade é uma surpresa, pois não é a mesma sensibilidade encontrada em doses equitóxicas de luz UVC

(Fig. 2.7A). Quando comparamos ao que obtivemos de sobrevivência com siATR, constatamos que cafeína sensibiliza muito mais a linhagem XP-V, indicando que seu efeito não seria somente pela inibição de ATR.

Figura 2.7. Comparação entre o inibidor cafeína e silenciamento de ATR por siRNA após luz UV em células XP-V. **A)** Sobrevivência clonogênica de células XP-V (XP30RO-SV40) 10 dias após inibição com 1 mM de cafeína e irradiação com UVC ou UVB em comparação com outras linhagens deficientes em reparo ou com silenciamento com siATR (N=4). **B)** Quantificação da população sub-G1 por citometria de fluxo para estimar morte celular 48 h após irradiação com luz UVB (N=2). Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **C)** Análise de ciclo celular das amostras em C, através da marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo (PI). **D)** Marcação de γ H2AX por imunofluorescência em microscopia e classificação em três grupos, de acordo com a intensidade de marcação observada 6 h após luz UVB (N=1). **E)** Representação das amostras em D, com sobreposição da marcação nuclear com DAPI (azul) e de γ H2AX (verde), mostrando marcação pan-nuclear após irradiação com luz UVB (aumento de 200x).

Diferentemente da sobrevivência clonogênica (que exige 2 semanas de crescimento das células), a análise de subG1 48 hpi mostra que siATR e cafeína induzem porcentagens de morte por apoptose (Fig. 2.7B). O efeito no ciclo celular causado por cafeína foi, novamente, semelhante ao siATR (Fig. 2.7C), entretanto na linhagem selvagem (MRC5) foi necessário uma dose maior (900 J/m^2) para observar o acúmulo em fase S observado com 600 J/m^2 em MRC5 siATR (Fig. 16A). Da mesma forma, cafeína induz aumento de γH2AX 6 hpi, com marcação pan-nuclear (Fig. 2.7D) e quando aumentamos a concentração de cafeína a porcentagem total de células positivas não aumenta, somente a porcentagem de células com marcação super brilhante (Fig. 2.7E), sugerindo, assim como com siATR, que a saturação está relacionada ao número de células em fase S, que é quando o estresse de replicação resultará em DNA simples fita em quantidade para fosforilação da histona H2AX.

2.2.7 A depleção de ATR pode afetar reparo de fotoprodutos em fase S, além de recuperação de transcrição

A resposta a danos no DNA, além de bloqueios no ciclo celular e controle da morte celular, também regula diretamente o reparo de DNA. Estudos indicam que ATR pode também afetar o reparo NER durante a fase S (AUCLAIR et al., 2008; LI et al., 2011). Dessa forma, medimos o reparo de duas formas diferentes: uma diretamente, medindo remoção de dímeros e outra, indiretamente, medindo transcrição de um gene repórter. Quantificamos remoção do dímero CPD (sigla em inglês - dímero de pirimidina ciclobutano), em uma população de células assíncronas, dentro de cada fase do ciclo celular. No tempo de 6 horas após UVB, tempo no qual as células não têm alterações no ciclo celular, verificamos que células XP-V têm menor remoção dessas lesões em fase S (Fig. 2.8A). Com silenciamento de ATR, observamos menor remoção de CPDs em fase S e G2/M nas células XP-V, porém somente ligeira redução em MRC5, a qual não foi estatisticamente significativa (Fig. 2.8A).

Dessa forma, para descartar que a replicação do genoma em 6 h pudesse afetar a medida de remoção de lesões, utilizamos outra técnica para medir reparo no DNA que não envolve replicação. Através da técnica *Host Cell Reactivation* (HCR), irradiamos um plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase e depois o transfectamos nas células-alvo. A luminescência relativa obtida após 48 h é relacionada à recuperação da transcrição do

plasmídeo, ou seja, uma medida indireta de seu reparo. O plasmídeo não possui origem de replicação em mamíferos e como o genoma celular não é irradiado, a recuperação é independente de resposta celular relacionada à alteração do ciclo. Este resultado também sugere que as células silenciadas em ATR, agora de maneira permanente por shRNA (*short hairpin* RNA) integrado ao genoma por infecção lentiviral, podem ter menor eficiência de reparo de fotoprodutos, especialmente na célula XP-V, em que o reparo ficou semelhante à linhagem XP-A usada como controle negativo por ser deficiente em NER (Fig. 2.8B).

Figura 2.8. A depleção de ATR afeta o reparo de fotoprodutos em fase S, além de recuperação de transcrição, após irradiação com luz UVB, em fibroblastos humanos imortalizados por sv40. **A)** Quantificação da remoção do dímero CPD em função do ciclo celular, através da intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo. Valores são normalizados com luz UVB o hpi (N=1). **B)** Western blot do silenciamento permanente por shRNA nas linhagens utilizadas na quantificação de reparo de DNA. *Host Cell Reactivation*, com a transfecção de plasmídeos com gene da luciferase previamente irradiado com UVC ou gene da renilla como controle de transfecção. O reparo das lesões no plasmídeo da luciferase é deduzido a partir da expressão gênica visualizada pela luminescência, a qual foi quantificada 48 horas após transfecção (N=1). Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

2.3 DISCUSSÃO

Fibroblastos humanos imortalizados com SV40 progridem à fase S mesmo com danos no DNA por serem deficientes no ponto de checagem de danos no DNA da fase G1 (p53 é inibido pelo antígeno T), o que gera maior instabilidade genômica. Nós constatamos que a depleção de ATR aumentou ainda mais o estresse durante a replicação e promoveu uma indução precoce de apoptose, antes que as células entrassem em mitose, após irradiação com luz UVB nestas células. Como esperado, observamos esse efeito com doses mais baixas de luz UVB em células deficientes em reparo por excisão global (linhagem XP-C) ou em síntese translesão (linhagem XP-V), apesar de que observamos resultados similares com doses maiores na linhagem selvagem MRC5 (proficiente em NER e TLS).

Ao silenciar a quinase ATR, poderíamos esperar que - ao perder ponto de checagem no DNA – essas células morressem por catástrofes na mitose, porém nossos resultados mostram que, sem ATR funcional, as células imortalizadas por SV40 tentam replicar o DNA lesionado, mas não conseguem completar a fase S e entram em apoptose. Após 48 hpi de luz UVB, enquanto células proficientes em ATR recuperam e acumulam em G2/M, células deficientes em ATR persistem com o perfil celular 24 hpi. Mesmo a linhagem de fibroblasto MRC5, proficiente em reparo de DNA e em síntese translesão é incapaz de progredir com estresse durante a replicação, já que células silenciadas não acumularam após tratamento com nocodazol e luz UVB. Assim, ATR regula a recuperação de bloqueio de replicação após luz UVB independente de pol η em fibroblastos humanos imortalizados com SV40.

Nossos resultados corroboram estudos anteriores sobre o papel de ATR em proteger células contra indução de morte por ativação de caspase-3 (AL-KHALAF; HENDRAYANI; ABOUSSEKHRA, 2012; MYERS et al., 2009). Após o silenciamento de ATR, a sensibilidade correlaciona com aumento de fosforilação de H2AX na ser 139, um marcador de duplas quebras no DNA (DSB – *double strand breaks*) após radiação ionizante (ROGAKOU et al., 1998). Entretanto, após luz UVB a marcação é pan-nuclear e não em *foci* como após radiação ionizante. Agora é mais claro que esse marcador não corresponde a DSB após luz UV (DE FERAUDY et al., 2010) e seu papel ainda é desconhecido já que a mutação em S139 não influencia na sensibilidade a luz UV. Entretanto, a perda completa de H2AX reduz a sobrevivência à exposição de luz UVB, o que sugere que outros sítios além de S139 poderiam afetar a sinalização de ATR (REVET et al., 2011). Após luz UVB, a marcação baixa de γ H2AX

distribuída por todo núcleo ocorre durante o reparo por excisão de nucleotídeos, com a formação de ssDNA como intermediário de NER (MARTI et al., 2006), estendido a longas lacunas de ssDNA pela nuclease Exo1 (GIANNATTASIO et al., 2010; LINDSEY-BOLTZ et al., 2014), enquanto que a marcação forte pan-nuclear em fase S pode estar associada à indução de apoptose (DE FERAUDY et al., 2010), mas ainda assim, esse remodelamento na cromatina pode ser usado como marcador de resposta ao dano no DNA (CLEAVER, 2011). Através da técnica iPOND (*i*solation of *p*roteins *on* *n*ascente *D*N*A*) foi possível verificar que quinases PIKK propagam a fosforilação de H2AX desde a forquilha bloqueada, estendendo-se por grandes domínios na cromatina antes que haja colapso da forquilha (SIRBU et al., 2011).

H2AX é descrito como sendo um alvo de ATR após estresse de replicação (WARD; CHEN, 2001), entretanto após o silenciamento de ATR nós observamos aumento da fosforilação dessa histona após irradiação com luz UVB em todas as células testadas. A diferença entre o experimento de 2001, em que foi observada diminuição de γ H2AX, é que foi utilizada uma construção mutada no sítio quinase (Kd – *kinase dead*). Assim, a ATR Kd seria capaz de ligar à H2AX mas não conseguiria catalisar a fosforilação e possivelmente impediria a ação de outras quinases redundante como ATM ou DNAPK (STIFF et al., 2004). Além de outras quinases, também não podemos descartar a possibilidade que os 30% restante de ATR após siRNA fossem responsáveis pela fosforilação observada de H2AX.

Outro fator que pode influenciar a importância de ATR e a sensibilidade à luz UV é o funcionamento de p53. Deficiências no guardião do genoma intensificam a sensibilidade de células à luz UV, mas isso pode diferir de como p53 é afetado. Células XP-V imortalizadas com XPV E6/E7 – processo que degrada p53 – são mais sensíveis quando comparadas às mesmas células XP-V imortalizadas com SV40 – processo que estabiliza p53, mas inibe sua atividade de fator de transcrição (CLEAVER et al., 2002). Mais recentemente, uma nova isoforma de p53 foi descrita: Δ p53. Essa isoforma apresenta sua atividade transcricional específica somente em células lesionadas em fase S (ROHALY et al., 2005); é um alvo de ATR e não é inibida pelo antígeno T de SV40 (ROHALY et al., 2010). Isso significaria, em nosso caso, que quando silenciarmos ATR, nós também afetaríamos p53, mesmo em células imortalizadas por SV40. P53 também inibe síntese translesão e células imortalizadas por SV40 realizam síntese translesão de dímeros CPD duas vezes mais eficiente do que células primárias (HENDEL et al., 2008). Até células XP-V – deficientes em pol η - imortalizadas com SV40 apresentam maior taxa de síntese translesão, através de outras DNA polimerases com

frequência de erro maior (HENDEL et al., 2008). Todavia, essa linhagem apresenta maior frequência de troca de cromátides irmãs (SCE – *sister chromatid exchange*) (CLEAVER et al., 1999b) e mais *foci* de Mre11 (LIMOLI et al., 2002), indicando dependência em mecanismos alternativos de recuperação de forquilha bloqueada baseado em recombinação homóloga.

Estudos anteriores mostraram que os inibidores cafeína e UCN ou até mesmo siRNA para Chk1 sensibiliza células XP-V mas não células selvagens (DESPRAS et al., 2010). Em nosso estudo, utilizamos siRNA para ATR e não somente inibidores inespecíficos para verificar que células XP-V são sensibilizadas à luz UVB na ausência dessa quinase. Apesar de respostas semelhantes entre cafeína e siATR, como suG1, ciclo celular e γ H2AX (Fig. 2.7B, C, D), o inibidor diferiu na sobrevivência em prazo maior, sensibilizando muito mais célula XP-V à luz UVB do que siATR (Fig 2.7A). Porém, siATR pareceu sensibilizar mais células selvagens do que cafeína, por afetar o ciclo celular e induzir morte em doses menores (Fig. 2.5A; 2.7B e C). Caso seja verdadeiro que siChk1 não sensibilizou mais células selvagens (DESPRAS et al., 2010), isso sugere que possam existir papéis de ATR independente de Chk1 e que sejam relevantes à sobrevivência celular contribuindo com vias de tolerância (talvez como uma proteína adaptadora, independente da atividade quinase), já que com siATR estamos afetando a proteína como um todo e não somente sua atividade quinase (diferentemente de ATR kd e cafeína). Em levedura, o homólogo de ATR, Mec1, tem papel no telômero no recrutamento de Tel1 (homólogo de ATM) (SUBRAMANIAN; NAKAMURA, 2010). Do mesmo modo, Chk1, outra serina/treonina quinase alvo de ATR, também possui função independente da atividade quinase (SPERONI et al., 2012).

Todavia, células selvagens depletadas em ATR foram incapazes de recuperar a replicação após irradiação com luz UVB (Fig. 2.6). Assim, tanto a síntese translesão quanto vias alternativas de tolerância – como troca da fita molde (*template switch*) e recombinação homóloga – foram comprometidas. Pol η também é alvo da fosforilação de ATR (CHEN et al., 2008; GÖHLER et al., 2011) e, dessa forma, acredita-se que parte da regulação da síntese translesão seria controlado pela quinase ATR, por recrutar Pol η de maneira mais eficiente. Porém, o mesmo sinal que ativa ATR – ssDNA formado pelo bloqueio da replicação – também é sinal para recrutar Rad18 (E3 ubiquitina ligase), o qual promove monoubiquitinação de PCNA na lisina 164 (HOEGE et al., 2002) de maneira independente de ATR (NIIMI et al., 2008). Acredita-se que a monoubiquitinação de PCNA (PCNA-Ub) regula a síntese translesão, por promover a troca de polimerases (KANNOUCHE; WING; LEHMANN,

2004; STELTER; ULRICH, 2003; WATANABE et al., 2004). Porém, estudos mais recentes indicam que PCNA-Ub somente melhora eficiência de TLS, já que não é necessário para recrutar polimerases translesão, mas sim para retê-las ao DNA lesionado (DESPRAS et al., 2012). Recentemente foi proposto que Pol η interage com FANCD2 e seria recrutada à forquilha bloqueada antes da monoubiquitinação de PCNA (FU et al., 2013). Além disso, TLS pode ocorrer mesmo sem a monoubiquitinação, apesar de que com eficiência menor e mutagênese alterada (HENDEL et al., 2011). Assim, nosso estudo corrobora que a síntese translesão eficiente depende tanto de via dependente e independente de ATR (ver modelo na Fig. 2.9). Além disso, para evitar bloqueio da forquilha diante de aumento de instabilidade genômica – por serem células imortalizadas com SV40 – múltiplas vias de tolerância funcionam coordenadamente. Se o bloqueio persiste, a forquilha colapsa e produz uma extremidade na dupla fita (DSE – double strand end), que difere de uma dupla quebra no DNA (DSB) por não possuir uma segunda extremidade para religar (SHRIVASTAV; DE HARO; NICKOLOFF, 2008). Ainda assim, de acordo com a literatura científica, proteínas envolvidas na recombinação homóloga – controladas também por ATR (SØRENSEN et al., 2005; WANG et al., 2004)– promoverão o recomeço da recombinação nessas extremidades, evitarão ativação de caspase-3 e, então, células serão capazes de progredir à mitose.

Parte da resposta ao dano no DNA também envolve reparo de DNA. Através da quantificação de lesões do tipo 6-4PP, foi proposto que ATR regularia o reparo global por excisão de nucleotídeos (AUCLAIR et al., 2008) e que o mecanismo ocorreria através da fosforilação e recrutamento da proteína XPA ao núcleo em fase S (WU et al., 2006, 2007), o qual teria participação também de p53 (LI et al., 2011). Em estudos de cinética de reparo é necessário ter cuidado com a proliferação celular para não considerar reparo de DNA o que de fato seria replicação de DNA durante fase S. Em nosso caso, devido à impossibilidade de sincronizar nossas células em G0/G1, por serem imortalizadas por SV40, utilizamos tempos curtos e quantificamos o dímero CPD, por ser a lesão transposta pela pol η . Na célula selvagem MRC5, não encontramos diferença de reparo entre as fases do ciclo, diferente da célula XP-V, a qual apresentou menor eficiência em fase S (Fig. 2.8A). Apesar de ser proficiente em reparo de DNA, já havia sido visto que deficiências em pol η poderiam diminuir eficiência de reparo de dímeros de pirimidina somente na fase S (AUCLAIR et al., 2010). Porém, célula XP-V possuem maior ativação de ATR em fase S (BOMGARDEN et al., 2006), assim, somente ativação de ATR não é suficiente para promover maior eficiência de

reparo de CPDs. Esses dados nos levam a crer que a persistência do bloqueio da replicação é o principal fator a inibir reparo durante fase S, já que tanto deficiências em ATR e pol η resultam em consequências similares. A dupla deficiente de ATR e pol η comprometeu ainda mais o reparo não só em fase S, como também em G2, o que sugere que em forquilhas continuam bloqueadas mesmo fora da fase S, provavelmente por mecanismos de preenchimento de lacunas deixadas (*gap filling*). Com o ensaio de *Host Cell Reactivation* não diferenciamos as fases do ciclo celular, mas os resultados indicam que células MRC5 obtiveram melhor eficiência de remoção de lesões, seguido da célula XP-V, MRC5 siATR e XP-V siATR, respectivamente. Tanto com quantificação de CPD, quanto com HCR, células deficientes tanto em ATR e pol η apresentaram reparo quase nulo, aproximando dos níveis da célula XP-A, deficiente nas duas subvias de NER, usado como controle negativo. Essa redução de reparo pode ser mais um fator que sensibilizaria as células após siATR, porém se essa redução resulta da persistência do bloqueio da forquilha frente à lesão – a qual inibiria reparo de DNA – a causa do fenótipo apresentado é a incapacidade de recuperar a forquilha e, assim, o reparo de DNA em si não seria um fator determinante para a sobrevivência da célula. Entretanto com HCR, os plasmídeos não são replicados e, ainda assim, ATR foi importante para que houvesse recuperação da transcrição, o que indica que essa quinase contribui em diminuir bloqueios de transcrição, possivelmente promovendo reparo de DNA.

Defeitos nos pontos de checagem de danos no DNA aumentam morte por mitose catastrófica, como um resultado da persistência de síntese de DNA na presença de estresse de replicação e indução de quebras cromossômicas, como sugerido por estudos com células deficientes no ponto de checagem de G1 e em ATR (NGHIEM et al., 2001). Entretanto, em nosso estudo com células imortalizadas por SV40 e depletadas em ATR, observamos sensibilidade relacionada à estresse de fase S (Fig. 2.4) e menos acúmulo nas fases G2/M após nocodazol (Fig. 2.6A), incluindo menos condensação prematura da cromatina mesmo com doses baixas de 100 J/m^2 (dados não mostrados). Essas células incorporaram menos BrdU, mas ainda assim a maioria da população teve marcação positiva (Fig. 2.6B) indicando que havia tentativa de replicação, mas mesmo assim as células não alcançaram a mitose. O estudo de Nghiem e colaboradores (2001) mostrou condensação prematura da cromatina em núcleos com defeito no ponto de checagem de danos no DNA em G1 através da superexpressão de MDM2, ciclina E ou HPV E6 – diferente da inativação de p53 pelo antígeno T de SV40 – e com cafeína ou ATR kd, afetando apenas o sítio catalítico da quinase.

Se as células não morrem por mitose catastrófica, então como podemos explicar nossa observação de que silenciamento de ATR induz morte de células ainda em fase S? ATR é vital para replicação mesmo sem danos exógenos (PETERMANN; CALDECOTT, 2006), incluindo importância na manutenção da estabilidade de sítios frágeis em cromossomos, evitando quebras e deleções ou rearranjos cromossômicos (CASPER et al., 2002). Assim, a sinalização de ATR está implicada em tumorigênese por impor uma barreira à progressão de câncer (FANG et al., 2004). ATR age localmente na estabilização da forquilha bloqueada e globalmente na inibição de novas origens de replicação (SØRENSEN; SYLJUÅSEN, 2012). Não é ao acaso que ssDNA ligado à RPA é o sinal ativador de ATR, já DNA simples fita é o denominador comum de estresse de replicação, independente da fonte, pelo desacoplamento da helicase com polimerases replicativas. Um recente trabalho (TOLEDO et al., 2013) propõe uma explicação simples de como células morreriam por uma catástrofe replicacional. Em condições normais, RPA é muito mais abundante que ssDNA, pois existe um controle do disparo de novas origens de replicação. Porém, quando ATR é depletado, esse controle é desregulado, mais origens de replicação são disparadas e a quantidade de ssDNA aumenta. Quando há uma excessiva quantidade de danos no DNA, os bloqueios da forquilha resultarão em mais ssDNA e chegará um ponto em que não haverá RPA suficiente para tanto ssDNA. Quando isso acontecer, o ssDNA ficará desprotegido e a forquilha colapsada será convertida em quebras pelas nucleases MUS81 e SLX4 (COUCH et al., 2013; FORMENT et al., 2011; FROGET et al., 2008; RAGLAND et al., 2013; TOLEDO et al., 2013). Dessa forma, células deficientes em pol η serão ainda mais sensibilizadas por siATR já que apresentarão mais forquilha bloqueada e ssDNA, esgotando RPA antes que células selvagens, apesar da proficiência em reparo por excisão de nucleotídeos.

A quinase ATR possui ao menos 570 alvos de fosforilação descrito (MATSUOKA et al., 2007; STOKES et al., 2007), incluindo proteínas do envelope nuclear como lamina A/C. Já foi descrito que deficiências na matriz nuclear aumenta o bloqueio de forquilhas de replicação após danos no DNA (SINGH et al., 2013), além de diminuir a estabilidade de *foci* de reparo de DNA (MAHEN et al., 2013), demonstrando a importância da arquitetura nuclear para replicação e reparo do DNA (KOEHLER; HANAWALT, 1996). Além disso, recentemente foi constatado que após danos no DNA, o núcleo é submetido a um largo reposicionamento cromossômico dependente da resposta ao dano no DNA mediada por ATM e ATR, em que alguns cromossomos densos em genes são deslocados do interior à periferia, enquanto

alguns cromossomos pobres em genes são deslocados da periferia ao interior (MEHTA et al., 2013), e que retornam à posição original após o reparo de DNA, sugerindo que esse remanejamento seja componente da resposta ao dano no DNA. Nas células silenciadas em ATR, é possível que essa deficiência afete inclusive a síntese translesão mesmo que não afete a monoubiquitinação de PCNA (que é independente de ATR). Além disso, afetando a arquitetura nuclear, outros processos no DNA poderiam ser afetados como vias alternativas por recombinação homóloga e até reparo por excisão de nucleotídeos.

Figura 13. Modelo da participação da quinase ATR na proteção da replicação de DNA lesionada por luz UVB. Itens sublinhados foram verificados experimentalmente neste projeto, enquanto itens com asterisco foram baseados na literatura científica. O Bloqueio da forquilha de replicação resulta em desacoplamento das helicase com as DNA polimerase e formação de ssDNA, o qual será protegido por ligação de RPA. O ssDNA é sinal para ativar ATR e RAD18 que promovem a síntese translesão, diminuindo o bloqueio da forquilha. Células deficientes em síntese translesão ativam mecanismos alternativos de tolerância, envolvendo proteínas de recombinação homóloga para promover a recuperação da forquilha, porém sem ATR esses processos também não acontecem. Nesse cenário de depleção de ATR, a quantidade de ssDNA supera a quantidade de RPA, o DNA simples-fita fica exposto e é alvo de nucleases gerando quebras em todo genoma, resultando em morte celular em fase S, antes d chegada à mitose.

Investigar como vias de resposta ao dano no DNA regulam reparo de DNA e vias de tolerância é vital para entender como a estabilidade genômica é mantida em células selvagens ou perdida em células tumorais. ATR não somente ativa parada no ciclo celular, mas regula a replicação e diferentes vias de tolerância, sendo uma quinase essencial para a proteção do genoma frente a danos no DNA que bloqueiam a replicação e sua inibição tem potencial para proteger contra carcinogênese induzida por luz UVB (CONNEY et al., 2007).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Cultura celular

Foram utilizadas as seguintes linhagens de fibroblastos humanos imortalizados por SV40, gentilmente cedidas pelo Dr. Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, França):

MRC-5V1 - fibroblastos de tecido pulmonar de embrião humano masculino de 14 semanas - proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos e síntese translesão (HUSCHTSCHA; HOLLIDAY, 1983);

XP30RO - fibroblasto de pele de paciente XP-V com mutação em homozigose com deleção dos nucleotídeos (c.343_355del) do gene *POLH*, resultando em uma proteína truncada com 42 aminoácidos e, assim, deficiente na síntese translesão mediada por pol η (MASUTANI et al., 1999);

XP4PA - fibroblasto de pele de paciente XP-C, carregando mutação em homozigose no nono exon (c.1643_1644delTG) no gene *XPC* e, assim, deficiente na subvia global de NER (SOUFIR et al., 2010);

XP12RO - fibroblasto de pele de paciente XP-A homozigoto para a mutação sem-sentido no códon Arg²⁰⁷ do gene *XPA* (SATOKATA et al., 1992) e, assim, deficiente nas duas subvias de NER.

As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (LGC Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Atena Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil), 1% de antibióticos e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO₂.

2.4.2 Congelamento e descongelamento de células

Para o congelamento, as células foram ressuspensas, após a tripsinação, em meio de cultura DMEM com 10% de SFB acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e distribuídas em ampolas de congelamento devidamente nomeadas. Em seguida, foram alocadas em um recipiente com isolamento térmico contendo isopropanol e deixadas em freezer -80 °C por 24 h, de modo que a decréscimo da temperatura fosse gradual, antes de serem estocadas em definitivo em galão com nitrogênio líquido.

Para descongelar células, as ampolas foram incubadas 37 °C e imediatamente diluídas em 5 mL de meio DMEM em um tubo de polipropileno de 15 mL. Em seguida, as células

foram centrifugadas por 2 min 1200 rpm e o meio de cultura contendo DMSO foi retirado por aspiração com bomba de vácuo. O precipitado celular foi ressuscitado em meio de cultura DMEM com 10% de SFB e alocado em garrafas de culturas mantidas em estufa a 37 °C. Após 24 h do descongelamento, o meio de cultura foi trocado novamente.

2.4.3 Irradiação com luz UVB

A irradiação com UVB foi realizada com uma lâmpada que emite principalmente no comprimento de onda de 312 nm (Fig. 2.10). Para isso, as células foram imersas em 1 mL de PBS em placas de 35 mm de diâmetro e irradiadas com a tampa da placa de polycarbonato (evitando incidência de UVC) e fluência em média de **3,5 J/m²/s**. A emissão da lâmpada foi estimada através de um dosímetro de UVB (radiômetro ultravioleta VLX 3W da Vilber Lourmat, França), e logo após a irradiação, adicionou-se novamente meio de cultura.

Figura 140. Espectro de emissão da lâmpada de UVB utilizada neste projeto, comparando a irradiação com a cobertura de placa de polycarbonato ou sem filtro nenhum.

2.4.4 Drogas e tratamento (cafeína e nocodazol)

Tratamento com Cafeína

A solução estoque de cafeína de 100 mM foi preparada em PBS e filtrada antes do uso. As células foram tratadas por 30 min antes da irradiação com luz UVB na concentração final de 1 mM de cafeína diluído no meio de cultura, o qual foi reaproveitado e mantido nas células em cultura após a irradiação até o momento da coleta.

Tratamento com Nocodazol

Aproximadamente 100 mil células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro e irradiadas após 24h. Foi adicionado nocodazol no meio de cultura na concentração de 100 ng/mL, logo após a irradiação ou 24 hpi e, então, incubado por 24 h até o momento em que as células foram coletadas por tripsinização.

2.4.5 Silenciamento por siRNA

Para efetuar o silenciamento foi feita uma dupla transfecção de siRNA com o reagente lipídico **Oligofectamina** (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Foram plaqueadas 670 mil células e cultivadas em meio sem antibiótico, em placas com 100 mm de diâmetro. Após 24 h do plaqueamento, procedeu-se a primeira transfecção. Em um microtubo diluiu-se 50,3 µL de Oligofectamina em 252 µL meio de cultura (sem antibiótico e soro fetal) e incubou-se por 7 min. Enquanto isso, em outro microtubo, diluiu-se **20 nM do siRNA** para ATR ou sequência controle (8,4 µL da solução estoque 20 µM) em 1174 µL de meio de cultura (sem antibiótico e soro fetal) e em seguida os conteúdos dos dois microtubos foram misturados e incubados por 20 min a temperatura ambiente, para então ser adicionado à placa de cultura previamente coberta com 6,9 mL de meio de cultura (sem antibiótico e soro fetal). Após 5 h da transfecção foi adicionado 2,4 mL de meio de cultura (sem antibiótico e SFB) mais 1,2 mL de SFB para cada placa para minimizar o efeito tóxico da Oligofectamina. Uma segunda transfecção, igual a anterior, foi realizada 24 h após a primeira transfecção. No dia seguinte, as células foram replaqueadas de acordo com a necessidade do experimento.

Sequências de siATR (Invitrogen - ATR-HSS100878 Stealth):

✓ Sequência I : 5' – UUA ACA UGU UCU UAC CCU CAG GUG G – 3'

Sequências de siCtrl (Qiagen, Catalog # 1027310):

✓ 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3'

2.4.6 Western Blot

Plaqueamento e extração de proteína

Células foram coletadas por tripsinização em diferentes tempos, centrifugadas por 2 min a 1500 rpm, lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas novamente e congeladas

imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C . Para extração de proteína total, o precipitado celular foi ressuspenso com 75 μl de solução do tampão RIPA (10 mM Tris-Cl pH 7,4; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS), acrescido do inibidor de proteases (Calbiochem; 1:500) e incubado por 20 min no gelo. Após centrifugada por 30 min a 14000 rpm e o sobrenadante estocado a -20°C .

Quantificação de proteína

A quantificação proteica foi feita pelo método de Lowry, através do kit BioRad DC Protein Assay (BioRad). Foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro, em filtro de 750 nm, de soluções com concentrações conhecidas de BSA (0 a 40 μg) e das amostras proteicas de interesse. Foi construída uma curva de concentração de proteína em relação a absorbância e, então, calculada a concentração das proteínas extraídas.

Eletroforese por gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE)

A identificação das proteínas β -Tubulina (55 KDa), Mre11 (74 KDa), Rad51 (37 KDa) e γH2AX (17 KDa) foi feito através de migração eletroforética em géis de acrilamida 12% (acrilamida 12%/bisacrilamida 0,2%; Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 1%; APS 1% e Temed 0,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$). Sobre este, foi aplicado um gel de empilhamento (acrilamida 3%/bisacrilamida 0,08%; Tris-HCL 0,155 M pH 6,8; SDS 0,1%; APS 0,1% e Temed 0,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$). Foi adicionado tampão de Laemmli às amostras e, antes de aplicá-las, elas foram fervidas em banho seco por 10 min, para desnaturar as proteínas antes da eletroforese. Utilizou-se o marcador de peso molecular *Kaleidoscope* (BioRad). Após isso, para cada amostra aplicou-se 50 μg de proteína ao gel e a eletroforese realizada a 70 V, por 15 h, ou 150 V por 5 h.

Transferência e revelação

A transferência das proteínas do gel à membrana de nitrocelulose (*Trans-Blot - Transfer Medium*, BioRad) foi feita com o aparelho de transferência semi-seca da Amersham Biosciences, no qual a transferência ocorre através do estabelecimento de uma corrente elétrica de 140 mA durante 90 min. Ao final, a eficiência de transferência foi checada com a administração da solução corante Ponceau S diretamente na membrana. Em seguida, foi feito o bloqueio da membrana, com TBS-T 1x pH 7,4 (19 mM Tris-Cl, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05% Tween 20) com 5% de leite desnatado, por 16 a 18 h a 4°C . Após disso, a membrana foi incubada com anticorpo primário ATR *goat*, policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) 1:200 por 18 h a 4°C , sob leve agitação. Em seguida, lavou-se a membrana 3 vezes, de 10 min cada, com TBS-T 1x e foi incubado com anticorpo

secundário *donkey anti-goat HRP* 1:1000 por 1 h a temperatura ambiente. A revelação foi feita por quimiluminescência e o sinal luminoso foi detectado utilizando-se fotodocumentador com câmera CDD (ImageQuant 300, GE HealthCare, Clevelan, OH, EUA). Para isso foi utilizado o *kit* Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

2.4.7 PCR em tempo real

Extração de RNA e obtenção de cDNA

Foram plaqueadas aproximadamente 40 mil células (em estado de não confluência) em placas com 401 mm² de área (*multiwell* de 12) e cultivadas por 48 h para a coleta das células. Em seguida, em cada ponto de coleta as células foram tripsinizadas e adicionou-se 400 µl do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A próxima etapa foi a adição de 80 µl de clorofórmio, agitando-se por 3 min. Após centrifugação a 4 °C a 13000 rpm transferiu-se o sobrenadante a outro tubo, adicionou-se 200 µl de isopropanol para precipitar o RNA e incubou-se em gelo por 5 min. Após nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 1 mL de etanol 75% (em água milli-Q tratada com DEPC). Por fim, fez-se nova centrifugação e dissolveu-se o precipitado em 75 µl do tampão TE (Tris-. HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Efetuamos a quantificação do RNA no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, EUA) e, em seguida, fizemos um tratamento com DNase, para degradação de DNA genômico (2 µg das amostras de RNA). Esse tratamento foi realizado com *kit DNase Treatment of RNA Samples Prior to RT-PCR* (Promega, Madison, WI, EUA), em que adiciona-se um tampão de reação e DNase e incuba-se a 37 °C por 30 min. Após o tratamento, realizamos a síntese de cDNA com o *kit High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) efetuando a adição de 2 µl de *Random Primers*, 1 µl de transcriptase reversa, 0,8 µl de dNTP Mix e 2 µl de tampão. Completou-se o volume para 20 µl com água DEPC e iniciou-se a RT-PCR em um termociclador (MJ Research PTC 100 - BioRad) com um programa de 25 °C por 10 min, seguido de 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 segundos.

Amplificação do cDNA

Em uma placa de 96-*well* foi adicionado em cada well 1 µl do cDNA (utilizado em diferentes diluições – sem diluição, diluído 10x ou 100x) ou 1 µl de água milli-Q (para

controle); *primer* em concentração 10 µM, tanto *reverse* quanto *forward*; 10 µl do *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) - sistema com fluoróforo que se liga somente à dupla-fita de DNA - e adicionado água milli-Q para completar o volume de 20 µl. Então, a leitura da fluorescência foi feita no aparelho **7500 Real Time PCR System** (Applied Biosystems), em que foi feita uma quantificação absoluta.

Quantificação do cDNA

Foi realizada a quantificação do cDNA correspondente ao RNAm de pol η em comparação de um transcrito de um gene de referência : β-actina. O modelo matemático utilizado foi baseado em (PFAFFL, 2001),

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{controle-amostra})},$$

em que expressão relativa (R) de um gene alvo é calculado baseado na eficiência da reação de RT-PCR (E) e no ciclo da reação de RT-PCR que acontece a amplificação (*crossing points* – CP) em uma razão do transcrito alvo sobre o transcrito de referência.

2.4.8 Sobrevivência clonogênica

Para cada ensaio, foram plaqueadas 1 mil células por placa de 60 mm de diâmetro (2827 mm²), através de contagem prévia das células por meio de uma câmara de Newbauer. Após cerca de 10 a 18 horas, as células foram irradiadas em um filme de 2 mL de PBS. Após o tratamento, as placas foram deixadas a 37 °C por 10 dias, deixando as colônias crescerem isoladas umas das outras e o meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias.

Em seguida, as colônias celulares foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 10% por 10 min, e então, coradas com uma solução de cristal de violeta 1% por 5 min. Foram computadas colônias com mais de 15 células e para contagem utilizou-se uma lupa de 4 vezes de aumento e os resultados de porcentagem de sobrevivência foram estimados em relação aos obtidos para grupo controle não irradiado.

2.4.9 Ensaio de citometria de fluxo – Fragmentação de DNA e ciclo celular

O plaqueamento foi realizado com 100 mil células semeadas em placas de 35 mm de diâmetro. Após 24 h do plaqueamento, as células foram irradiadas com lâmpada de luz UVB, nas doses desejadas.

Após 48 h, as células foram coletadas, tanto as aderidas (através de tripsina) quanto as em suspensão, e transferidas para tubos de 15 mL. Estas foram centrifugadas a 1500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi fixado com 1 mL de etanol 70% gelado e estocado a -20°C ao menos por 2 h. No dia da leitura, as células foram centrifugadas novamente e o precipitado lavado com PBS. Uma nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado em 200 μL de uma solução PI (iodeto de propídeo 20 $\mu\text{g/mL}$, RNAase 200 $\mu\text{g/mL}$, triton X-100 0,1%, diluídos em PBS) e mantido no escuro por ao menos 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, a solução PI foi desprezada e o precipitado celular foi ressuspensionado em PBS para a leitura da fluorescência no citômetro Guava EasyCyte Plus System (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA). Para a análise, utilizou-se um software (Guava Express Pro) para a quantificação da população em sub-G1 (considerado como, na condição controle, toda fluorescência inferior a do primeiro pico, o qual corresponde à fase G1 do ciclo celular), e então, mostrava-se a porcentagem dessa população em todas as amostras. Para quantificação do ciclo celular foi utilizado o software ModFit LT (*Verity Software House*, Topsham, ME, EUA).

2.4.10 Detecção de γH2AX ou Caspase 3 em função do ciclo celular por citometria de fluxo

O plaqueamento foi realizado com 100 mil células semeadas em placas de 35 mm de diâmetro. Após 24 h do plaqueamento, as células foram irradiadas e coletadas 6 h após a irradiação com UVB, através de tripsinização. Após uma lavagem com PBS e consequente centrifugação (1500 rpm por 2 min) para a separação das células, elas foram fixadas com 1% de formaldeído (solução em PBS), sendo mantidas 15 min em gelo. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 1 mL etanol 70% por ao menos 2 h a -20°C . Após esse tempo, lavou-se com 500 μL de uma solução BSA 1%, Triton X-100 0,2% em PBS (BSA-T-PBS). Centrifugou-se a 2000 rpm por 2 min e foi adicionado ao precipitado celular 500 μL de BSA-T-PBS, o qual foi incubado por 5 min em temperatura ambiente sob leve agitação para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos. Nova centrifugação foi realizada e ao precipitado celular adicionou-se 50 μL de BSA-T-PBS com anticorpo primário monoclonal IgG, mouse, anti- γH2AX Ser 139 (Millipore) na proporção 1:300 e incubado por 16 h a 4°C .

Em seguida, as amostras foram lavadas com 500 μL de BSA-T-PBS, centrifugadas a 2000 rpm por 2 min e ao precipitado celular adicionado 50 μL de BSA-T-PBS com anticorpo

secundário anti-*mouse* FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) na titulação 1:200 e incubado em temperatura ambiente por 1 h mantido no escuro. Após esse tempo, ao final da nova lavagem com 500 μ L de BSA-T-PBS, adicionou-se 200 μ L de uma solução PI e as amostras foram mantidas no escuro por ao menos 30 min em temperatura ambiente. Por último, lavou-se com PBS e foi transferido a uma placa para a leitura do material no citômetro Guava EasyCyte Plus (Guava Technologies). Para Caspase 3 ativa, foi incubado diretamente com um anticorpo primário já conjugado com FITC, Rabbit anti-active caspase 3 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA) na proporção 1:10 em 30 μ L por 16h (overnight) seguindo direto para a lavagem e incubação com solução de PI.

2.4.11 Detecção de BrdU ou CPD em função do ciclo celular em citometria de fluxo

Cerca de 150 mil células em crescimento exponencial foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro e 24 h depois foram irradiadas com luz UVB. Elas foram coletadas em diferentes tempos, por tripsinização, e fixadas com 1 mL de etanol 75% por 16-18 h a -20°C .

Após esse tempo as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 min, sendo o precipitado celular resultante lavado com 500 μ L de PBS. As células foram então centrifugadas novamente e incubadas por 20 min a 37°C em 1 mL de solução de pepsina (Sigma-Aldrich – Solução 14 μ M: 0,49 g/L em 1,5% de HCl 2M). Após nova centrifugação, a solução foi retirada e o precipitado celular foi ressuscitado em 500 μ L de HCl 2M e incubado por 20 min a temperatura ambiente (Para facilitar o acesso dos anticorpos aos fotoprodutos ou o BrdU, porém, a partir daqui, o precipitado celular não é mais visível). Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS e, após nova centrifugação, as células foram incubadas em 1 mL de tampão de hibridação (0,5% soro fetal bovino; 0,5% Tween 20; 20 mM de Hepes em solução de PBS). Após nova centrifugação, as células foram incubadas em 100 μ L de tampão de hibridação contendo o anticorpo monoclonal mouse, anti-CPD, clone TDM-2 (MBL, Woburn, MA, EUA) na proporção de 1:2000 ou o anticorpo BrdU (Dako M0744) na proporção de 1:100, por 1 h a temperatura ambiente ou por 16-18 h a 4°C .

Após incubação com o anticorpo primário, foi adicionado 1 mL de PBS e nova centrifugação foi realizada. Em seguida, as células foram incubadas no escuro por 45 min a temperatura ambiente com 100 μ L do tampão de hibridação com o anticorpo secundário, anti-*mouse* FITC (Sigma), na proporção de 1:200.

Após incubação com o anticorpo secundário, foi adicionado 1 mL de PBS e as células foram centrifugadas novamente. Por fim, as células foram incubadas em 200 μ L de solução com PI 30 min no escuro. Para retirar o excesso de PI, as amostras foram lavadas com 300 μ L de PBS, centrifugadas e depois ressuspensas em 200 μ L de PBS filtrado para leitura no citômetro de fluxo.

2.4.12 Imunofluorescência

O plaqueamento foi realizado com células em crescimento exponencial, sendo semeadas 100 mil células por placa com 35 mm de diâmetro com 3 lamínulas de 13 mm de diâmetro, as quais foram previamente esterilizadas. Após 24 h do plaqueamento, as células receberam seus tratamentos com cafeína e UVB, e foram fixadas com 800 μ L de metanol 100% por 15 min a -20°C . Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 800 μ L por placa de BSA 2% em PBS, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após o bloqueio, incubaram-se as lamínulas com o anticorpo primário monoclonal IgG, mouse anti- γ H2AX Ser 139 (Millipore) na proporção 1:500 e incubado por 1 h a temperatura ambiente. Para isso, colocou-se 24 μ L para cada lamínula em uma superfície da placa, sendo as lamínulas invertidas sobre este conteúdo para que o volume se distribuisse.

Após a incubação, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes de 10 min com PBS e incubadas, em seguida, com anticorpo secundário anti-*mouse* FITC (Sigma-Aldrich) diluído em BSA 1% em PBS na titulação 1:200 durante 1 h em temperatura ambiente e mantido no escuro. O procedimento foi igual à incubação do anticorpo primário com gotas de 24 μ L para cada lamínula. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes de 10 min com PBS.

Por último, as lamínulas foram transferidas a lâminas com a adição de 2 μ L de DAPI para marcação dos núcleos das células e observadas em microscópio de fluorescência.

2.4.13 Análise estatística

Os resultados representam a média de dois a quatro experimentos independentes, cada um em triplicada, com barras de erro indicando o desvio padrão. Diferenças estatísticas entre amostras foi medida através da análise Two-way ANOVA, com teste de bonferroni usando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA EUA).

CAPÍTULO 3:

POTENCIALIZAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS PELA SENSIBILIZAÇÃO DA RESPOSTA AO DANO NO DNA

3.1 INTRODUÇÃO

Drogas derivadas de platina estão entre os agentes quimioterápicos mais usados e efetivos no tratamento de tumores de testículo, carcinomas de ovário, pulmão, cabeça e pescoço (JAMIESON; LIPPARD, 1999). Em 1965, foi descoberto que o composto conhecido como cisplatina é capaz de inibir divisão celular de bactérias e, em seguida, testes indicaram que o composto foi altamente efetivo em diminuir a massa de sarcomas de ratos (ROSENBERG et al., 1969). Cisplatina possui atividade antitumoral por induzir lesões no DNA através da ligação covalente da platina com resíduos de purinas, formando ligações cruzadas (*cross-link*) intra ou inter-fita, e são mais citotóxicas durante a fase S, provavelmente pelo potencial de inibir a replicação do DNA. Como consequência, lesões no DNA induzidas por cisplatina ativam vias de sinalização em resposta ao dano no DNA dependente de ATR-Chk1 (LEWIS et al., 2009) e p53 (BHANA et al., 2008). Entretanto, tratamento com cisplatina é limitado pelos efeitos colaterais dependente da dose como nefro e neurotoxicidade, que podem resultar em neuropatia e perda de audição, além da limitação pela resistência tumoral adquirida à droga (WANG; LIPPARD, 2005). Deste modo, formas de potencializar a quimioterapia por cisplatina seriam necessárias para diminuir a limitação de seu uso no tratamento antitumoral.

Um potencial alvo é a via de sinalização em resposta ao dano no DNA, o qual protege a célula tumoral da toxicidade da cisplatina. Apesar da resposta de ATR-Chk1 frente a lesões induzidas por compostos de platina, inibidores de Chk1 não foram capazes de sensibilizar células frente a esses agentes (WAGNER; KARNITZ, 2009). Pelo fato da quinase ATR estar relacionada ao controle da replicação e que sua ausência frente a danos na forquilha de replicação pode resultar em catástrofe replicacional (TOLEDO et al., 2013), faz de ATR um alvo promissor para sensibilizar tumores a agentes que bloqueiem a replicação. Inibidores mais específicos para ATR foram descobertos recentemente, como NU6027 e VE-822, e estão tendo resultados promissores (FOKAS et al., 2012; PEASLAND et al., 2011).

Entretanto, ainda assim, inibidores químicos podem apresentar inespecificidade e não afetariam possíveis funções independentes da atividade quinase de ATR. Assim, decidimos investigar o potencial de ATR para sensibilizar tumores após quimioterapia por cisplatina através do silenciamento gênico específico de ATR através de siRNA em linhagens tumorais com diferenças na atividade de p53. Estima-se que mais de 50% dos tumores tenham mutações no fator de transcrição p53 (HOLLSTEIN et al., 1991) e, dessa forma, o silenciamento de ATR poderia contribuir para reduzir efeitos colaterais da quimioterapia. Doses menores de cisplatina seriam suficientes para matar seletivamente células tumorais enquanto que células com p53 intacto apresentariam ponto de checagem em G1, mediado por p53, e não seriam afetadas pela depleção da quinase ATR.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Depleção de ATR reduz proliferação celular de linhagens tumorais deficientes em p53

Testamos o efeito do silenciamento de ATR por siRNA em linhagens de glioblastomas com p53 mutado ou selvagem. Através do sistema xCELLigence, realizamos o monitoramento em tempo real da proliferação celular, de modo não invasivo com sensores que medem a impedância elétrica gerada pela adesão das células na placa. Para nossa surpresa - mesmo na ausência de agentes causadores de danos no DNA - somente as linhagens mutadas em p53 (U138MG e U251MG) apresentaram crescimento celular menor a partir do quinto dia após a primeira transfecção com siATR (Fig. 3.1C, D). Já as linhagens com p53 selvagem (U87MG e U343MG) não apresentaram diferenças no crescimento celular mesmo após 9 dias após o silenciamento (Fig. 3.1A, B).

Dessa forma, pela importância de ATR na replicação de DNA mesmo na ausência de danos externos (PETERMANN; CALDECOTT, 2006), verificamos se as células mutadas apresentavam alterações no ciclo celular. Com a análise de incorporação por iodeto de propídeo em citômetro de fluxo, observamos que somente a linhagem mutada em p53 - com silenciamento de ATR - apresentou o dobro de células em fase S oito dias após a transfecção com siATR, mesmo na ausência de danos exógenos (Fig. 3.2B), o que não foi observado na linhagem tumoral com p53 selvagem (Fig. 3.2A), indicando que p53 juntamente com ATR protege contra estresse de replicação gerado por lesões endógenas no DNA

Figura 3.1. Depleção de ATR reduz proliferação celular de linhagens tumorais deficientes em p53. Ensaio de proliferação celular utilizando o aparelho XCelligence em gliomas humanos após transfecção com 40 nM de siRNA com sequência controle (siCtrl) ou tendo a quinase ATR como alvo (siATR). **A)** Linhagem U87MG (p53 selvagem). **B)** Linhagem U343MG (p53 selvagem). **C)** Linhagem U138MG (p53 mutada). **D)** Linhagem U1251MG (p53 mutada).

3.2.2 Depleção de ATR potencializa morte celular induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53.

A depleção de ATR pode potencializar a sensibilização de quimioterápicos que induzem danos no DNA que resultam em bloqueio de replicação e inibição de transcrição. Dessa forma, testamos o tratamento com o quimioterápico cisplatina e primeiramente realizamos o ensaio de de XTT (Fig. 3.9 – ver materiais e métodos) para determinar a viabilidade celular após tratamento com diversas concentrações de cisplatina para cada uma das linhagens de células de glioma (Fig. 3.3A). Resultados em nosso laboratório, realizados pela doutoranda Clarissa Ribeiro, indicam que a sensibilidade dessas linhagens de glioma ao quimioterápico cisplatina independe do status de p53 e estaria mais relacionada à quantidade de glutatona na célula. O silenciamento de ATR sensibilizou todas linhagens de

glioma testadas ao quimioterápico cisplatina, entretanto, nosso resultado mostra que as células U138MG (p53 mutado) foram muito mais sensíveis que as células U87MG (p53 selvagem). Quando comparamos a concentração de cisplatina que induz 50% de sobrevivência, o IC_{50} , observamos que U87MG (p53 selvagem) silenciada em ATR é 6 vezes mais sensível que o controle (Fig. 3.3B), enquanto que a U138MG (p53 mutada) silenciada é 40 vezes mais sensível, após 120 h ou 5 dias de tratamento (Fig. 3.3C).

Figura 3.2. Perfil do ciclo celular após silenciamento de ATR, em células de glioma humanos, mostra complicações em fase S, mesmo sem indução exógena de danos no DNA. Análise de ciclo celular por citometria de fluxo através da marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo (PI) foi realizada após transfecção com 40 nM de siRNA. Gráficos superiores mostram a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular com respectivo desvio padrão (N=2; Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$) e gráficos inferiores mostram um perfil de ciclo celular representativo 120 h após silenciamento com siRNA. **A)** U87MG (p53 selvagem). **B)** U138MG (p53 mutado).

Como o ensaio de XTT mede a viabilidade celular através de atividade mitocondrial, decidimos quantificar morte através da análise por subG1 e ciclo celular. Quando tratada com cisplatina, mesmo com concentrações muito baixas como 0,5 μ M, a porcentagem de células em subG1 aumentou significativamente já 48 h após o quimioterápico somente na célula mutada em p53 (Fig. 3.4A). A linhagem U87MG foi mais sensibilizada por siATR após

cisplatina em tempos maiores, mas ainda assim, a sensibilização em U138MG foi 2x maior (Fig. 3.4A). A análise do ciclo celular destas células indica que o aumento da morte em U138MG relaciona-se ao acúmulo de células em fase S e diminuição de células em G0/G1, o que não observamos na linhagem com p53 selvagem (Fig. 3.4B). É importante ressaltar o perfil celular de U87MG (59% em G0/G1 e 24% em fase S) difere de U138MG (46% em G0/G1 e 43% em fase S), sem cisplatina e siATR (Fig. 3.4B). Mesmo que p53 não seja o único responsável por essa diferença, o fato de possuir mais células em fase S (e estresse de replicação) parece explicar a maior sensibilização de U138MG frente à cisplatina após silenciamento de ATR.

Figura 3.3. Depleção de ATR potencializa sensibilização induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53. **A)** Desenho experimental com transfecção de 40 nM de siRNA dividido em dois dias e tratamento com cisplatina 72 h após primeira transfecção. **B)** Citotoxicidade de cisplatina em células de glioma humano com depleção na quinase ATR: linhagem selvagem (U87MG – gráficos superiores) ou mutada em p53 (U138MG - inferior) foram tratadas nas doses indicadas por 3 dias, 4 dias ou 5 dias antes da determinação de viabilidade celular por XTT (N=2)

Figura 3.4. Depleção de ATR potencializa indução de apoptose e alteração no ciclo celular induzida pelo quimioterápico cisplatina, preferencialmente em linhagens tumorais deficientes em p53. Linhagens de gliomas humanos foram transfectados com 40 nM de siRNA e tratados com 0,5 μM cisplatina por até 5 dias. **A)** Quantificação da população sub-G1 em citometria de fluxo, após marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo (PI), para estimar a morte celular por apoptose. **B)** Perfil do ciclo celular das linhagens U87MG (p53 selvagem) e U138MG (p53 mutada), tratados com de cisplatina por até 5 dias após silenciamento de ATR por siRNA (N=2). Estatística com Two-way ANOVA: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

3.2.3 Depleção de ATR também potencializa morte celular induzida por cloroquina e este efeito é anulado pelo antioxidante N-acetil L-cisteína.

Glioblastoma multiforme é um dos tumores mais comuns e mais agressivos do sistema nervoso central. Atualmente, pacientes têm sobrevida mediana de 15 meses, apesar de terapia combinada de neurocirurgia, radiação e temozolomida (PREUSSER et al., 2011). A dificuldade de tratamento inclui a barreira hemato-encefálica, a qual impede a administração da maior parte dos quimioterápicos, como cisplatina. Um agente muito estudado atualmente é a cloroquina (CQ), uma droga lisossomotrópica também usada no tratamento de malária (SCHLITZER, 2007), por ser um adjuvante de temozolomida na terapia de glioblastomas. Apesar do mecanismo de indução de morte não ser completamente compreendido, evidências sugerem que a CQ causa permeabilização da membrana do lisossomo (GENG et al., 2010), o que resultará em liberação de captesinas no citossol e formação de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias (ZHAO et al., 2003).

Em nosso laboratório foi observado pelo doutorando Alexandre Vessoni que a linhagem de glioma U138MG - mutada em p53 – não só era mais resistente à CQ, mas também apresentava acúmulo em fase S, indicando que a droga também provoca complicações durante a replicação. Assim, decidimos testar se o silenciamento de ATR poderia sensibilizar células de glioma frente à CQ.

Surpreendentemente, o silenciamento de ATR sensibilizou U138MG frente a todas as doses de cloroquina testadas (Fig. 3.5A). O aumento da morte foi acompanhado de menos células em fase G2/M, o que pode indicar que as células morreram ao passar pela replicação (Fig. 3.5B). De acordo com a hipótese de que o estresse oxidativo induzido por cloroquina é responsável pela sensibilização das células de glioblastoma, o tratamento com o inibidor de espécies reativas de oxigênio N-acetil L-cisteína (NAC) restabeleceu os níveis de morte de U138MG aos do controle não tratado (Fig. 3.5). De mesma forma, NAC impediu a sensibilização de siATR após tratamento com cloroquina (Fig. 3.5A), sugerindo que ATR também é responsável por uma resposta ao dano no DNA induzida por estresse oxidativo e que sua inibição tem potencial terapêutico contra quimioterápico de diferentes origens, contanto que resultem em estresse de replicação.

Figura 3.5. Depleção de ATR também potencializa morte celular induzida por cloroquina e este efeito é anulado pelo antioxidante N-acetil L-cisteína . **A)** Quantificação de população sub-G1 após tratamento com diferentes concentrações de cloroquina (Fluka) por 3 dias e reversão da morte com o co-tratamento com o antioxidante N-acetil L-cisteína, através de citometria de fluxo (N=2). **B)** Perfil do ciclo celular na linhagem U138MG (p53 mutada) da mesma amostra de A.

3.3 DISCUSSÃO

O quimioterápico cisplatina induz adutos no DNA que distorcem a dupla hélice e resultam em bloqueio da replicação e transcrição (SIDDIK, 2003). Através da depleção da quinase ATR – envolvida na estabilização de forquilhas bloqueadas - nós potencializamos a morte induzida pelo quimioterápico, sendo este efeito dramático nas linhagens com mutação em p53, o que corrobora trabalhos anteriores (REAPER et al., 2011). Descobrimos ainda que somente o silenciamento de ATR – sem lesões exógenas – já compromete a proliferação celular quando p53 não é funcional, por gerar mais estresse durante a replicação e que contribui para potencializar a sensibilização do tratamento com cisplatina (Fig. 3.6). Por fim, descobrimos que a depleção de ATR também potencializa morte induzida pelo quimioterápico cloroquina, o qual sensibiliza pela indução de estresse oxidativo. O fato de que seu tratamento resulta em acúmulo de células em fase S e que o antioxidante NAC – precursor da síntese de glutathione - recupera a sensibilização, corrobora que o estresse oxidativo gerado é responsável pela morte celular e que a proteção diante desse estresse dependente também da sinalização de ATR.

A ideia de inibir quinases envolvida na resposta ao dano no DNA para tratar tumores não é nova (ZHOU; ANDERSON; ROBERGE, 2003). Dificuldades são encontradas em como inibir especificamente os alvos e inclui mecanismos eficientes de entrega na célula tumoral. A administração de siRNA consegue inibir especificamente o alvo, porém a entrega *in vivo* ainda é um desafio principalmente em relação à segurança, manutenção da estabilidade do siRNA dentro da corrente sanguínea e entrega eficiente em órgãos (LEE; YOON; CHO, 2013; SHIM; KWON, 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). Desse modo, inibidores são a maior aposta hoje para potencializar morte de quimioterápicos. Diversos inibidores de Chk1 foram ou estão em testes clínicos para oncoterapia: UCN-01; ZD7762 (Astra Zeneca); PF-477736 (Pfizer); SCH900776 (Schering Plough) e LY2606368 (Eli Lilly) (DENT et al., 2011). Infelizmente, nos testes clínicos de fases 1 e 2 realizados com inibidores de Chk1 combinados com quimioterapia tradicional, ainda não existem relatos de aumento significativo do controle do tumor ou da sobrevivência dos paciente. Além disso, o inibidor de Chk1 sozinho não teria um efeito antitumoral - já que precisaria de outra droga para induzir danos no DNA – o que colocaria esse inibidor em desvantagem na prioridade de desenvolvimento de novas drogas.

Figura 3.6. Letalidade sintética: Modelo de como a depleção de ATR contribui na potencialização do quimioterápico cisplatina. **A)** Cisplatina induz bloqueio da forquilha de replicação devido a indução de cross-links, A resposta da célula envolve p53 e ATR diminuindo a replicação de modo que diminua estresse durante a fase S. **B)** Quando p53 não está funcional, o número de forquilhas bloqueadas aumenta, mas ATR é sinalizado e consegue promover recomeço da replicação, diminuindo um pouco a morte celular. **C)** Quando ATR está ausente, o recomeço da forquilha é evitado e as forquilhas bloqueadas resultarão em mais morte celular. **D)** Porém, quando tanto ATR quanto p53 não funcionam a quantidade de forquilha bloqueada aumenta ainda mais e é quando observamos mais morte celular.

Mais recentemente, inibidores mais específicos para ATR (VE-821; VE-822 e NU-6027) foram descobertos e vistos como um novo potencial para terapia. Estes teriam seletividade por células deficientes em p53, por siRNA para p53 ou imortalização com HPV E6 (REAPER et al., 2011) e foram eficazes em diferentes tipos de tumores, como de mama e ovário (PEASLAND et al., 2011; SULTANA et al., 2013), além de pâncreas (FOKAS et al., 2012), câncer de cólon e pulmão (REAPER et al., 2011). Nossos dados corroboram que células com deficiência em p53 são mais sensibilizadas por cisplatina em células deficientes em ATR e expande a lista de linhagens tumorais - adicionando glioblastomas - sensibilizadas, reafirmando potencial universal da inibição de ATR em potencializar morte de tumores. Além disso, encontramos evidências de que o silenciamento de ATR - por si só - afeta o crescimento somente de linhagens deficientes em p53, o que oferece vantagens em relação a menos efeitos colaterais e o coloca com vantagens em relação ao desenvolvimento de novas drogas.

Além da inibição de ATR sensibilizar diferentes linhagens, nós encontramos evidências de seu potencial com agentes quimioterápicos com distintos modos de ação. Tratamento com cloroquina estabiliza p53 e induz seus alvos transcricionais em células U87MG (KIM et al., 2010). Foi quantificado aumento de MDM2 e p21, relacionados ao controle do ciclo celular; além de Bax e PIG3 envolvidos na indução de apoptose, resultando em acúmulo de células em G1. Entretanto, não foi encontrado fosforilação de p53 na serina 15, um alvo de ATM/ATR relacionado à estabilização de p53 em resposta a dano no DNA. O silenciamento de p53 em U87MG diminui a morte celular induzida por cloroquina, indicando que estabilização de p53 (independente por qual via) possui um papel pró-apoptótico (KIM et al., 2010). Com isso, células de glioblastoma com mutação de p53 são mais resistentes ao tratamento com cloroquina, justamente o que observamos com U138MG. Nesta linhagem, cloroquina induz acúmulo de células em fase S (Fig. 3.5B), o que indica perda da ativação da parada em G1 e existência de estresse durante a replicação. Neste contexto, silenciamento de ATR potencializou a morte dessa linhagem frente à cloroquina, porém não causou nenhum efeito na presença do antioxidante NAC (Fig. 3.5A), o que sugere que estresse oxidativo está envolvido no estresse durante a replicação e que ativa resposta dependente de ATR.

ATR é uma quinase cuja atividade relacionado à resposta ao dano no DNA induzida por luz UV e estresse durante a replicação, enquanto que ATM é responsável pela resposta às duplas-quebras no DNA e estresse oxidativo (SANCAR et al., 2004). Então, como cloroquina induziria resposta mediada por ATR? Recentemente, foi constatado que peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induz fosforilação de Chk1 dependente de ATR, mas não de ATM. Além disso, em extrato de ovos de *Xenopus*, foi visto que essa resposta é dependente da nuclease APE2, que é recrutada à cromatina lesionada pelo PCNA (WILLIS et al., 2013). Assim, a atividade de APE2 resulta em extensão de ssDNA, através da excisão a partir da quebra iniciada pelo reparo da lesão oxidada, o que poderia ativar ATR e explicar a participação dessa quinases na resposta ao tratamento com cloroquina (Fig. 3.7). Outra possibilidade é que estresse oxidativo resulte em lipoperoxidação e formação de adutos que distorcem a dupla-hélice, como 4-Hidroxononenal, e induzem ativação de ATR (CHAUDHARY et al., 2013). De qualquer jeito, estresse oxidativo seria capaz de gerar ssDNA que se ligaria à RPA e ativaria ATR.

Mutações em homozigose da quinase ATR resultam em anormalidades de desenvolvimento e letalidade do embrião (BROWN; BALTIMORE, 2000). Em humanos, mutações em heterozigose estão associadas à síndrome de Seckel, caracterizada por microcefalia, problemas de desenvolvimento, retardo de crescimento e anormalidades do esqueleto (ALDERTON et al., 2004). Camundongos adultos com depleção de ATR, através da técnica de nocaute condicional, apresentam defeitos na homeostase de tecidos e aparecimento de fenótipo de envelhecimento de maneira precoce, relacionado à perda de células-tronco (RUZANKINA et al., 2007). Enquanto camundongos heterozigotos para ATR apresentam um ligeiro aumento na incidência de tumores, camundongos com nocaute condicional para ATR não apresentaram nenhum tumor, o que indica que a perda completa de ATR não promove tumorigênese *in vivo* (RUZANKINA et al., 2007). A deficiência na sinalização de ATR aumenta a instabilidade genômica e, da mesma forma que poderia induzir morte, poderia gerar novas mutações e tumorigênese. É conhecido que HPV modula a via de ATR pela degradação de Claspin (SPARDY et al., 2009), estimulando estresse de replicação e se beneficiando da instabilidade genômica (KORZENIEWSKI et al., 2011). Da mesma forma, o vírus Epstein-Barr aumenta a expressão do fator de transcrição STAT3 e o resultado é o comprometimento da sinalização de ATR em fase S, pela degradação de Claspin (KOGANTI et al., 2014). Esse é mais um exemplo de como vírus manipulam a

Figura 3.7. Modelo de como a depleção de ATR contribui na potencialização do tratamento com cloroquina. Cloroquina causa permeabilização da membrana do lisossomo, o que resultará em liberação de catesinas no citossol e formação de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias. O Peróxido de hidrogênio pode entrar no núcleo e oxidar diretamente o DNA ou reagir com membranas e produzir aldeídos como produto da lipoperoxidação, lesionando indiretamente o DNA. O início do reparo de bases oxidadas no DNA é uma excisão, a qual pode ser estendida pela APE2, geral ssDNA recoberto com RPA, o que ativará ATR. Caso aldeídos lesionem o DNA, a replicação pode ficar bloqueada frente à lesão e também produzirá o sinal para ativar ATR: ssDNA recoberto por RPA.

instabilidade genômica a favor da tumorigênese. Assim, poderíamos imaginar que o uso de inibidores de ATR como adjuvantes em oncoterapia poderia induzir níveis baixos de morte celular, porém a longo prazo selecionaria tumores ainda mais agressivos. Entretanto, nossos dados corroboram estudos específicos para ATR em que a tumorigênese existe em cenário de leve estresse replicacional acompanhado de complicações de disjunção durante a mitose (perda parcial de ATR associado a danos no DNA), enquanto que com estresse de replicação exacerbado induziria morte em fase S antes que rearranjos cromossômicos aparecessem (perda total de ATR acompanhado de mutação em p53 e ou vias de tolerância, como pol η , na presença de danos no DNA) (Fig. 3.8).

Figura 3.8. Modelo de como sensibiliza células após danos no DNA. Normalmente o estresse durante a replicação seria resolvido pela ativação de ATR (centro). Em células com deficiência parcial em ATR e poucos danos no dano não conseguiriam inibir a replicação e os danos seriam convertidos em quebras e instabilidade genômica na mitose, que é o caso da modulação de vírus como HPV usando a favor da progressão tumoral (acima). Entretanto, com grande quantidade de danos durante a replicação na ausência de ATR e p53, resultará em catástrofe da replicação e morte ainda em fase S (abaixo). Deste modo, a depleção de ATR pode ser usada como ferramenta para matar tumores.

Dessa forma, temos evidências para acreditar no potencial terapêutico da modulação de ATR no tratamento de tumores. Atualmente testes têm sido feitos através de inibidores de nova geração como o VE-822 e NU6027. Com nossos dados, constatamos efeitos na proliferação celular em tumores deficientes em p53 somente pelo silenciamento com siATR e permanece a questão se os inibidores – que não eliminam a proteína, mas inibem somente sua atividade catalítica - produzirão os mesmos resultados observados quando a proteína inteira é depletada. É possível que com descoberta de novas funções de proteínas envolvidas na resposta ao dano no DNA, como ATR, possamos compreender não só a origem da tumorigênese, mas também promover alternativas de tratamentos mais eficientes de combate ao câncer.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Cultura celular

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais de gliomas humanos: **U87MG** e **U343MG** (p53 selvagem); **U138MG** e **U251MG** (p53 mutado) (ISHII et al., 1999).

As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (LGC Biotecnologia), suplementados com 10% de SFB, 1% de antibióticos e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida 5% CO₂.

3.4.2 Drogas e tratamento (cisplatina, cloroquina e NAC)

Preparo de solução estoque de cisplatina

Cis-diaminodicloro platina (II) (cisplatina) foi obtida da Sigma (EUA) e dissolvida, no mesmo dia do uso do tratamento, em água milli-Q estéril para preparo soluções estoque 2 ou 5 mM. Para concentrações iguais ou superiores a 5 mM, incubou-se a solução de um dia para outro, protegida da luz a 37°C para completa solubilização da droga.

Preparo de solução de N-acetil L-Cisteína (NAC)

Para tratamento com N-Acetil L-Cisteína (NAC, Sigma, EUA), uma solução estoque foi preparada dissolvendo NAC em meio de cultura DMEM, filtrado e usado em concentração final de 10 mM em DMEM suplementado com 10% de SFB.

Preparo de solução de cloroquina (CQ)

Cloroquina difosfato (CQ, Fluka Biochemika, Suíça) foi dissolvida em água Milli-Q e filtrado para então ser diluído no meio de cultura na concentração desejada.

3.4.3 Silenciamento por siRNA

Descrito no capítulo 2, página 65.

3.4.4 Ensaio de citometria de fluxo – Fragmentação de DNA e ciclo celular

Descrito no capítulo 2, página 68.

3.4.5 Determinação de viabilidade celular por XTT

Aproximadamente 2 mil células das linhagens de U87MG (p53 selvagem) ou U138MG (p53 mutada) foram plaqueadas em placas de 96 *well*. Após 24 h do plaqueamento, as células foram tratadas com cisplatina e, após este período, foram lavadas com PBS. Em seguida, acrescentou-se a mistura contendo o agente acoplador de elétrons e o sal tetrazolium, na proporção de 1:50, por 30 min. Células saudáveis, com mitocôndrias intactas, clivam o XTT gerando o corante formazan (Fig. 3.9) através da ação da enzima desidrogenase mitocondrial, o que resulta numa coloração alaranjada (*Cell Proliferation Kit II* - Roche, Basel, Suíça). O produto da reação foi lido nos comprimentos de onda de 490 e 650 nm no espectrofotômetro GloMax (Promega). O valor obtido a 492 nm foi subtraído do obtido a 650 nm, e calculou-se a porcentagem de viabilidade celular, expressos em relação às amostras não tratadas. Dois experimentos independentes foram efetuados em triplicatas.

Figura 3.9. Ensaio de viabilidade celular por XTT. A) Estrutura química do sal XTT e de seu produto após metabolização em mitocôndrias viáveis, o Formazan. B) Comparação do espectro de absorção de XTT (linha tracejada) e do formazan (linha contínua). Adaptado do manual de *Cell Proliferation Kit II* (XTT), Roche.

3.4.6 Proliferação celular com XCelligence

O plaqueamento foi realizado com 20 mil células semeadas em placas de 96 poços com microeletrodos no fundo de cada poço (96-*well E-Plate*, Roche, EUA). Após 30 min, a placa foi alocada no equipamento xCELLigence *Real-Time Cell Analyzer* (RTCA) da Roche, EUA, dentro de uma estufa onde as células cresceram por seis dias. O aumento do tamanho e do número de células leva a aumento da impedância, de onde deriva o valor de *cell index*, que se correlaciona ao número de células aderidas na placa (ATIENZA et al., 2005).

3.4.7 Análise estatística

Descrito no capítulo 2, página 71.

CAPÍTULO 4:

RECUPERAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO APÓS LUZ UV EM ESCALA GENÔMICA

4.1 INTRODUÇÃO

Dímeros de pirimidina induzidos por luz ultravioleta bloqueiam a transcrição (MASTERS; PARDEE, 1962) e ameaçam a sobrevivência celular, pois prejudicam a regulação da síntese de proteínas e informações essenciais ao funcionamento das células. O reparo de excisão por nucleotídeos preferencial em genes expressos foi descrito na década de 80 (BOHR et al., 1985) em células de hamsters e contribuiu para explicar como seria recuperada a síntese de RNA após luz UV. Da mesma forma, estudos em *E. coli* (MELLON; HANAWALT, 1989) também documentaram existência de reparo acoplado à transcrição mais eficiente do que reparo de DNA global em bactérias. Estes estudos analisaram a remoção de fotoprodutos em apenas um gene, *DHFR* em mamíferos e *LacZ* em *E. coli*, mesmo assim essa característica é generalizada como sendo igual para todo o genoma. A espécie humana apresenta aproximadamente 23 mil genes, os quais apresentam diferentes características como: tamanho; nível de expressão gênica e marcadores epigenéticos. Assim, uma possibilidade é que genes mais expressos apresentem reparo acoplado à transcrição mais eficiente e, como consequência, recuperação da transcrição mais rápida do que genes menos expressos.

Entretanto, evidências indicam que recuperação da síntese de RNA em diversas linhagens mutantes em reparo não se correlaciona com capacidade de reparo por excisão, mas somente com sobrevivência após irradiação com luz UV (MAYNE; LEHMANN, 1982), o que sugere que a remoção das fotolesões não é o único fator que coordena a recuperação da transcrição após dano no DNA. Dessa forma, nós utilizamos a metodologia Bru-Seq (PAULSEN et al., 2013a) para mapear a síntese de RNA em escala genômica, através da marcação do RNA nascente com bromouridina (BrU) seguido de sequenciamento de nova geração do RNA nascente imunoprecipitado com anti-BrU. O mapeamento dessas sequências gera um transcriptoma único, já que podemos analisar a recuperação da transcrição individual de todos genes do genoma humano e avaliar quais características contribuem com a recuperação da síntese de RNA após luz UV.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Bru-Seq, uma nova abordagem para análise individual da síntese de RNA de genes em escala genômica

RNA encontrado na célula é resultado da contribuição tanto do RNA nascente quanto da degradação e estabilidade desse RNA. Dessa forma, análises tradicionais de expressão gênica que quantificam somente o RNA total das células não contemplam toda a complexidade do controle da expressão gênica. Com o intuito de analisar especificamente a contribuição do RNA nascente, o laboratório do Prof. Mats Ljungman desenvolveu uma técnica para mapear RNA recém-transcritos em todo genoma. Sua técnica, nomeada de Bru-Seq, está baseada na marcação do RNA nascente com o análogo de uridina BrU e de sequenciamento de nova geração do RNA nascente, imunoprecipitado com anticorpo anti-BrU (PAULSEN et al., 2013b; VELOSO et al., 2013). Através de construção de bibliotecas fita-específicas, é possível visualizar a síntese de RNA individualmente para cada gene, distinguindo de qual cada fita de DNA foi observada transcrição (Fig. 4.1A). Neste exemplo, representando 700 kbp do cromossomo 6, observamos 4 genes anotados, sendo que dois deles na fita positiva (verde) e dois na fita negativa (vermelho). Dos quatro genes, três apresentam diferentes níveis de síntese de RNA – medido por RPKM (*Reads per kilo base per million mapped reads*) - e apenas um gene (C6orf7) não foi transcrito em fibroblastos selvagens (Fig. 4.1A). É importante lembrar, que devido à posição do gene entre uma fita ou outra, a direção da síntese de RNA é da esquerda para a direita na fita positiva (verde), enquanto na fita negativa (vermelha) é da direita para a esquerda (Fig. 4.1A). Também podemos notar que alguns genes não terminam sua síntese de RNA onde está anotado o término do gene, como observado para o gene BCKDHB. Além disso, é possível detectar RNA antissenso, o qual, por ser pouco estável, geralmente não é detectado em análises de RNA total (Fig. 4.1A). Através dessa técnica, detectamos que 34% do genoma de fibroblastos selvagens em cultura é transcrito (Fig. 4.1B), sendo que 10% destes transcritos correspondem a regiões exônicas; 75% a regiões intrônicas, 3% a RNA antissenso e 12% a regiões intergênicas (Fig. 4.1B) podendo incluir regiões não anotadas.

Figura 15. Dados obtidos com técnica Bru-Seq. A) Mapa mostrando 700 kbp no cromossomo 3, com 2 genes anotados (HG19 – browser genômico da UCSC) na fita positiva (em verde) e 2 genes na fita negativa (vermelho) e os respectivos RNAs nascentes em condições normais de cultura celular. Os genes são representados abaixo do gráfico através de caixas, em que exons são as partes hachuradas e introns as partes brancas, além do sentido da transcrição indicado por seta. Note a diferença de transcrição entre genes, incluindo um gene não transcrito (C6orf7) e que em alguns genes a síntese de RNA continua além da notação do gene (BCKDHB). **B)** Distribuição do genoma humano e relação entre o sinal obtido por Bru-Seq em fibroblastos selvagens, além da proporção do genoma em que foi encontrado sinal.

4.2.2 Irradiação com luz UVC inibe a elongação, mas não a iniciação da transcrição

Para estudar a síntese de RNA e sua recuperação após luz UVC, irradiamos as células com luz UV antes da marcação com BrU. Quando agregamos a síntese de todos os genes maiores que 20 mil pares de base (kpb) a partir do sítio de início da transcrição, observamos, como esperado, que as lesões geradas por luz UVC inibiram a síntese de RNA de maneira dependente da dose. Porém, as leituras obtidas no sequenciamento se concentram na extremidade 5' dos genes enquanto que as leituras ao longo dos genes diminuem, refletindo a inibição da elongação mas não da iniciação da transcrição (Fig. 4.2A). É importante

salientar, que apesar de que os “picos” induzidos por UVC próximos ao início da transcrição apresentem valores de RPKM maiores do que os encontrados no controle não irradiado, não podemos dizer que existe necessariamente uma indução. Isso ocorre porque o sequenciamento de cada amostra envolve sempre 60-80 milhões de leituras e quando o número de leituras diminui ao longo do gene, aumenta a representação de leituras no início da transcrição, o que faz dos dados gerados por Bru-Seq representarem a distribuição de leituras sequenciadas ao invés de valores absolutos.

Figura 16. Irradiação com luz UVC inibe a elongação, mas não a iniciação da transcrição, de maneira dependente com o comprimento do gene. Fibroblastos foram irradiados com luz UVC e incubados por 30 min com BrdU para marcar o RNA nascente. **A)** Gráfico agregado com RNA nascente relativo de genes mais longos que 100 kbp (sinal alinhado para o início da transcrição) mostra que após luz UVC, as leituras obtidas no sequenciamento se concentram na extremidade 5' dos genes enquanto que as leituras ao longo dos genes diminuem de maneira dose dependente. **B)** Efeito da luz UVC na transcrição relativa em função do tamanho dos genes. Maior o gene, menor a razão do sinal da amostra irradiada comparada com o controle não irradiado e, portanto, maior é a inibição da transcrição. **C)** O comprimento mediano de genes induzidos ou inibidos em 2 vezes ou mais, logo após luz UVC ou ao final de 6 horas após a irradiação.

4.2.3 Indução ou inibição da transcrição é influenciada pelo comprimento do gene

Nossos dados com fibroblastos primários selvagens mostram uma esperada correlação negativa entre intensidade de leituras e comprimento de genes após irradiação com luz UVC (Fig. 4.2B), confirmando que genes mais longos são mais inibidos por dímeros de pirimidina. A mediana do comprimento de 709 genes com redução de 2x ou mais na

síntese relativa de RNA logo após irradiação com 10 J/m^2 luz UVC (somente 30 min de incorporação de BrdU) foi de 201,77 kbp. Enquanto que a mediana do comprimento de genes com aumento de 2x ou mais da transcrição relativa foi de 7,67 kbp (Fig. 4.2C; painel superior). Quando a dose de luz UVC foi de 20 J/m^2 , a mediana do comprimento de genes induzidos diminuiu para 6,22 kbp, enquanto que a de genes inibidos diminuiu para 169,3 kbp (Fig. 4.2C; painel inferior). Essas descobertas são consistentes com a ideia de que lesões causadas por luz UVC inibem a elongação, mas sem inibir o início da transcrição, preferencialmente de genes longos. Após 6 hpi com luz UVC, observamos recuperação da transcrição, já que mediana do comprimento de genes induzidos aumentou, enquanto que diminuiu para os genes inibidos (Fig. 4.2C; painéis do lado direito).

4.2.4 Reparo global por excisão de nucleotídeos contribui para a recuperação de transcrição em genes longos, após irradiação com luz UVC

Através de uma cinética, com coleta em diferentes tempos após irradiação com luz UV, avaliamos como os diferentes genes recuperam a síntese de RNA. Enquanto fibroblastos humanos selvagens recuperaram a síntese de RNA 24 hpi mesmo em genes longos com mais de 100 kbp (Fig. 4.3A), fibroblastos primários deficientes em XPC, apresentam atraso na recuperação somente na extremidade 3' de genes longos (Fig. 4.3B), indicando que o reparo global contribui para recuperar a transcrição após luz UVC no término desses genes. Já fibroblastos deficientes em CSB - portanto, somente no reparo acoplado à transcrição - mostraram menor recuperação mesmo entre 20 e 40 kbp em genes longos (Fig. 4.3C), e inclusive em genes menores que 50 kbp, reafirmando a importância do comprimento do gene quando analisamos a recuperação da transcrição após luz UVC.

Para comparar as diferentes linhagens, quantificamos a mediana do sinal sequenciado em relação ao início da transcrição nos genes maiores que 100 kbp. Dessa forma, se os genes não encontrarem bloqueios na transcrição, a mediana em genes com 100 kbp será em torno de 50 kbp, já toda RNA polimerase chegará ao final do gene. Já a amostra irradiada, devido às RNA polimerases bloqueadas, apresentará concentração de leituras próxima ao início da transcrição e a mediana será menor. Com a recuperação da transcrição ao longo do tempo, a mediana retornará ao controle não irradiado, apresentando valores próximos de 50 kbp.

Figura 17. Recuperação da transcrição após 10 J/m^2 de luz UVC em genes longos (>100 kpb) em fibroblastos primários humanos deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos, através de Bru-Seq. Após irradiação com luz UVC, foi feito um pulso de BrU 30 min antes da coleta do RNA. **A)** Fibroblasto selvagem (Ctrl) proficiente em reparo NER. **B)** Fibroblasto XP67TMA, deficiente em XPC, **C)** Fibroblasto CS1AN, deficiente em CSB. **D)** Comparação entre recuperação da transcrição após luz UVC entre diferentes linhagens através da mediana do sinal obtido em cada amostra para os gráficos agregados com genes longos em A, B e C. Em cima, gráfico de barras com valores da mediana. Em baixo, mesmo dados apresentados através da porcentagem de recuperação.

Desse modo, observamos que o atraso de recuperação da transcrição do fibroblasto XP-C ocorre somente no tempo de 24 hpi, enquanto que no fibroblasto primário CS-B existe uma leve recuperação nos tempos mais longos de 6 e 24 hpi (Fig.4.3D). Esses dados sugerem que o reparo acoplado à transcrição é mais eficiente nas primeiras 6 hpi, já que se mesma eficiência fosse mantida, células XP-C deveriam ter recuperado completamente a síntese de RNA 15 hpi (Fig. 4.3E). Assim, o reparo acoplado à transcrição contribui para a recuperação desde as primeiras horas, enquanto que o reparo global contribui mais ao longo prazo e principalmente em genes mais longos.

4.2.5 Genes altamente expressos ou induzidos por UVC não apresentam recuperação da transcrição mais eficiente

Como o reparo acoplado à transcrição é fundamental para recuperar a transcrição após irradiação com luz UVC, avaliamos se o nível de expressão de um gene contribui para a eficiência da recuperação da síntese de RNA. A hipótese mais plausível é que em genes muito expressos, haverá mais bloqueio da RNA polimerase e, portanto, recrutamento de reparo de DNA resultando em recuperação mais rápida comparada a genes com pouca expressão. Para isso, agregamos genes maiores do que 100 kbp, dividindo-os em cinco grupos: 1) Expressão alta (Síntese > 3 RPKM); 2) Expressão média ($1 < \text{Síntese} < 2$ RPKM); 3) Expressão baixa ($0,3 < \text{Síntese} < 1$ RPKM); 4) Induzidos por luz UVC 24 hpi – genes com razão > 1,5 vezes; 5) Inibidos por luz UVC 24 hpi – genes com razão < 0,75 vezes a síntese de RNA comparado ao controle não irradiado. Com essa análise, observamos que os perfis agregados de genes muito expressos e de genes induzidos por luz UVC não diferiram do controle com genes com diferentes expressões (Fig. 4.4A), sugerindo que a expressão elevada não aumenta a eficiência da recuperação da síntese de RNA. Do mesmo modo, genes inibidos por luz UVC ou com pouca expressão também não tiveram a recuperação da transcrição afetada (Fig. 4.4B), indicando que a expressão gênica não é uma característica que limita a recuperação da síntese de RNA após danos no DNA.

4.2.6 Síntese de RNA de genes induzidos por 10 J/m^2 luz UVC retorna ao nível basal 24 hpi em fibroblastos selvagens, mas não em células deficientes em NER

Através do Bru-Seq podemos avaliar individualmente a recuperação de diferentes genes. Quando observamos um gene pequeno como o gene de p21 (*CDKN1A*), com 10,8 kpb, não visualizamos inibição do alongamento da transcrição com 10 J/m^2 de luz UVC, já que o característico pico de UV na extremidade 5' do gene está ausente (Fig. 4.5A). Com essa dose de luz UVC, esperamos em média 1 lesão a cada 7 kbp (LJUNGMAN, 1999), o que significa 1 lesão a cada 14 mil bases na fita transcrita. Devido ao fato de que a formação de uma lesão no DNA é independente da formação de outra, e de termos uma média constante de lesões para cada mil pares de base numa dada dose, podemos usar a distribuição de Poisson para modelar a probabilidade de quantas lesões devemos encontrar no gene de p21.

Figura 18. Genes altamente expressos ou induzidos por UVC não apresentam recuperação da transcrição mais eficiente. **A)** Gráficos agregados de genes longos (> 100 kbp) com diferentes padrões de expressão gênica: Ctrl (Síntese > 0,3 RPKM); Expressão baixa (0,3 RPKM < Síntese < 1 RPKM no controle não irradiado); Expressão média (1 RPKM < Síntese < 2 RPKM no controle não irradiado); Expressão alta (Síntese > 5 RPKM no controle não irradiado); Induzidos por luz UVC 24 hpi (genes com razão > 1,5 vezes); Inibidos por luz UVC 24 hpi (genes com razão < 0,75 vezes). **B)** Comparação entre recuperação da transcrição após 10 J/m² de luz UVC entre os diferentes grupos de genes em fibroblastos selvagens através da mediana do sinal obtido em cada grupo para os gráficos agregados com genes longos em A.

De acordo com a distribuição de Poisson neste caso (média de eventos por intervalo: $m=0,77$), esperamos que cerca de 45% das fitas transcritas do gene de p21 com nenhuma lesão; 36% com somente uma lesão; 14% com duas lesões e que os outros 5% apresentem 3 lesões ou mais. Como as células são diploide, as chances de inibir as duas cópias do gene de p21 é muita reduzida. Dessa forma, por ser um alvo transcricional de p53 (WEI et al., 2006), observamos indução em toda extensão do gene de p21 após irradiação com luz UV, atingindo o máximo 6 hpi e reduzindo 24 hpi (Fig. 4.5A).

Figura 19. Recuperação da transcrição após 10 J/m^2 de luz UVC em genes alvos de p53, através de Bru-Seq. **A)** Gene *CDKN1A* (p21) - 10,8 kbp. **B)** Gene *MDM2* - 37,2 kbp. **C)** Gene *POLH* (pol η) - 44,3 kbp. Todos com transcrição no sentido da esquerda para a direita. Dados indicam que síntese de RNA de genes induzidos por luz UVC retorna ao nível basal 24 hpi em fibroblastos selvagens com 10 J/m^2 , mas não após 20 J/m^2 ou em células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeo.

Já em genes maiores, como *MDM2* (E3 ubiquitina ligase, regulador negativo de p53), *POLH* (polimerase translesão pol η) e *DRAM1* (modulador de autofagia), observamos o pico de UV na extremidade 5' do gene, já que com 40 mil bases, a distribuição de Poisson (média de eventos por intervalo: $m=2,85$) prevê apenas 6% das fitas transcritas sem lesão nenhuma. Assim como *CDKN1A*, tanto *MDM2* (Fig. 4.5B) quanto *POLH* (Fig. 4.5C) e *DRAM1* (Fig. 4.6A) também são alvos transcrpcionais de p53 (LIU; CHEN, 2006; WEI et al., 2006; XIE et al., 2012) e apresentaram indução máxima 6 hpi, retornando próximo dos níveis basais 24 hpi nos fibroblastos primários selvagens, mas não nas linhagens deficientes XP-C e CS-B (Fig. 4.5 painéis inferiores). Nestas células a indução se mantém elevada 24 hpi, indicando que a sinalização em resposta a dano no DNA persiste nessas células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos. Assim como nos gráficos agregados (Fig. 4.3), a situação é mais dramática na linhagem CS-B, já que o acúmulo de sinal na extremidade 5' do gene persiste mesmo 24 hpi e a indução após luz UV continua a aumentar, como no caso de *POLH* (Fig. 4.5C) e *DRAM1* (Fig. 4.6A).

Em seguida, analisamos exemplos de genes com alta expressão, como o *ANXA2* (anexina 2, envolvido em mobilidade celular e associado ao citoesqueleto e matriz extracelular) (Fig. 4.6B), em que a transcrição está presente na fita negativa e, portanto transcrito da direita para a esquerda. Da mesma forma que com genes induzidos por luz UVC, como *MDM2*, *POLH* e *DRAM1*, vemos que após 6 hpi com luz UVC - apesar da taxa de transcrição elevada - ainda existe um acúmulo de sinal na extremidade 5' do gene, indicando que as RNA polimerases ainda não conseguem progredir sem bloqueio até a extremidade 5' dos genes, o que observamos somente 24h após UVC (Fig. 4.6B).

Com o dobro de lesões no DNA, após irradiação com 20 J/m^2 de luz UVC em fibroblasto selvagem, o gene de p21 ainda não apresenta acúmulo de sinal na extremidade 5' do gene e inibição da elongação da transcrição (Fig. 4.5A painel inferior) e, assim como *MDM2*, *POLH*, *DRAM1*, mantém expressão um pouco mais elevada mesmo 24 hpi, assemelhando-se com a célula primária XP-C irradiada com 10 J/m^2 de luz UVC.

Além de todas essas informações sobre síntese de RNA, com essa técnica de Bru-Seq também conseguimos detectar diferentes isoformas de um mesmo gene, como visto no gene *SESN1* (Fig. 4.6C). É possível observar dois inícios de transcrição indicados pelo pico induzido na amostra logo após UVC (0h). Ao longo do tempo, apenas a menor isoforma - na extremidade 3' do gene - é induzida pela luz UVC e do mesmo modo que *CDKN1A*, *MDM2*,

POLH e *DRAM1*, retorna mais próximo aos níveis basais no fibroblasto selvagem, mas não nas linhagens deficientes (Fig. 4.6C).

Figura 20. Recuperação da transcrição após 10 J/m² de luz UVC de genes com expressão distinta. **A)** Gene *DRAM1* – 46,3 kbp, gene de autofagia induzido por luz UVC. **B)** Gene *ANXA2* – 50,8 kbp, gene altamente expresso. **C)** Gene *SESN1* – 108,0 kbp – e visualização de 2 inícios de transcrição pela formação de 2 picos após irradiação, sendo a menor isoforma induzida após luz UVC. *ANXA2* e *SESN1* com transcrição no sentido da direita para a esquerda, por estarem na fita negativa.

4.2.7 Luz UVC induz síntese de RNA de genes envolvidos em regulação do reparo de DNA, processamento de RNA, regulação de tradução, ciclo celular, apoptose e autofagia

Além da análise individual de alguns genes com esperada indução após luz UVC, avaliamos globalmente quais grupos de genes são preferencialmente induzidos ou inibidos nas diferentes linhagens deficientes em reparo de DNA. Para isso, selecionamos genes com expressão maior que 0,5 RPKM na amostra não irradiada e com indução/inibição de 2x ou mais após o tempo de recuperação pós-irradiação, para evitar falsos positivos em nossa lista. Em seguida, a lista de genes foi submetida à análise de classificação funcional DAVID (david.abcc.ncicrf.gov) para reduzir as enormes listas em grupos de genes relacionados e ajudar a desvendar as respostas celulares desencadeadas.

Figura 21. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m^2 de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. Vias são representadas por genes induzidos ou inibidos 2 vezes ou mais após irradiação com luz UVC e sequenciamento de RNA nascente, obtido por marcação com pulso de BrdU nos últimos 30 min antes da coleta. **A)** Vias induzidas 6 hpi (994 genes). **B)** Vias induzidas 24 hpi (69 genes). **C)** Vias inibidas 6 hpi (412 genes). **D)** Vias inibidas 24 hpi (51 genes). Enriquecimento foi realizado usando a ferramenta de bioinformática DAVID (david.abcc.ncicrf.gov) e os números mostrados representam a significância do enriquecimento pelo valor de p.

Fibroblastos primários selvagens irradiados com 10 J/m^2 apresentaram 994 genes induzidos 6 hpi envolvidos em processamento de RNA, tradução, ciclo celular, replicação do DNA, organização mitocondrial, apoptose e autofagia (Fig. 4.7A), refletindo as respostas necessárias para combater bloqueios de transcrição e replicação induzidos por dímeros de pirimidina. Dentre os 25 genes mais induzidos, encontramos **BTG2** (inibidor de fator de transcrição – regula negativamente transição entre as fases G1/S do ciclo celular); **CDKN1A** (p21 – inibidor de ciclina dependente de quinase – também regula negativamente transição entre as fases G1/S do ciclo celular); **PCNA** (fator de processividade da replicação do DNA); **DDB2** (proteína de reconhecimento de lesões induzidas por luz UVC junto com XPC) e **FAS** (antígeno de apoptose – receptor de morte) (Tabela 4.1). Já 24 hpi, apenas 69 genes foram induzidos relacionados ao ciclo celular e apoptose (Fig. 4.7B), sugerindo que células praticamente resolveram os danos provocados por 10 J/m^2 , não havendo necessidade de continuar com indução de tantos genes de resposta ao dano no DNA.

Figura 22. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m^2 de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em XPC. Vias são representadas por genes induzidos ou inibidos 2 vezes ou mais após irradiação com luz UVC e sequenciamento de RNA nascente, obtido por marcação com pulso de BrdU nos últimos 30 min antes da coleta. **A)** Vias induzidas 6 hpi (821 genes). **B)** Vias induzidas 24 hpi (582 genes). **C)** Vias inibidas 6 hpi (500 genes). **D)** Vias inibidas 24 hpi (283 genes). Enriquecimento foi realizado usando a ferramenta de bioinformática DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov) e os números mostrados representam a significância do enriquecimento pelo valor de p.

Figura 23. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 10 J/m^2 de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em CSB. Vias são representadas por genes induzidos ou inibidos 2 vezes ou mais após irradiação com luz UVC e sequenciamento de RNA nascente, obtido por marcação com pulso de BrdU nos últimos 30 min antes da coleta. **A)** Vias induzidas 6 hpi (957 genes). **B)** Vias induzidas 24 hpi (1437 genes). **C)** Vias inibidas 6 hpi (188 genes). **D)** Vias inibidas 24 hpi (411 genes). Enriquecimento foi realizado usando a ferramenta de bioinformática DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov) e os números mostrados representam a significância do enriquecimento pelo valor de p.

Nas células deficientes em XP-C (Fig. 4.8A) e CS-B (Fig. 4.9A), a indução 6 hpi foi muito similar à observada no fibroblasto primário selvagem (Fig. 4.7A), com 821 e 957 genes, respectivamente, pertencentes aos mesmos grupos funcionais. Porém, a situação 24 hpi é distinta: XP-C ainda induziu 582 genes, enquanto que CS-B aumentou a lista para 1437 genes 24 hpi. Alguns novos grupos funcionais foram induzidos 24 hpi, como organização lisossomal, resposta a estresse oxidativo, regulação de pH intracelular, ubiquitinação de proteínas e resposta a estresse em retículo endoplasmático, o que sugere que não recuperar a transcrição resulta em novos transtornos fora do núcleo. Essa resposta das células deficientes em reparo de DNA 24 hpi foi encontrada também em fibroblastos primários selvagens irradiados com o dobro da dose de luz UVC (20 J/m^2), com a indução de 927 genes incluindo grupos funcionais de resposta a estresse oxidativo, organização de lisossomo, ubiquitinação de proteínas e transporte de endossomo (Fig. 4.10A). Apesar da proficiência

em reparo de DNA, a dose elevada de luz UVC induziu danos além das capacidades de recuperação do fibroblasto selvagem e mesmo 24 hpi a célula ainda induz sinalização.

Figura 24. Enriquecimento de genes em vias funcionais após irradiação com 20 J/m² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. Vias são representadas por genes induzidos ou inibidos 2 vezes ou mais após irradiação com luz UVC e sequenciamento de RNA nascente, obtido por marcação com pulso de BrdU nos últimos 30 min antes da coleta. **A)** Vias induzidas 6 hpi (966 genes). **B)** Vias induzidas 24 hpi (927 genes). **C)** Vias inibidas 6 hpi (571 genes). **D)** Vias inibidas 24 hpi (213 genes). Enriquecimento foi realizado usando a ferramenta de bioinformática DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov) e os números mostrados representam a significância do enriquecimento pelo valor de p.

4.2.8 A inibição da transcrição causada por luz UVC afeta genes da organização do citoesqueleto, adesão celular, endocitose e mitose

Do mesmo modo que com indução de genes, fibroblastos primários selvagens inibiram grande quantidade de genes 6 hpi com 10 J/m² de luz UVC, mas esse número foi muito reduzido 24 hpi. Após 6 hpi, foram inibidos 412 genes envolvidos em migração celular, organização do citoesqueleto, angiogênese, matriz extracelular e controle negativo de apoptose (Fig. 4.7C). Enquanto que 24 hpi, apenas 51 genes continuaram inibidos, relacionados somente ao citoesqueleto e controle negativo da apoptose (Fig. 4.7D). Na linhagem XP-C, a redução de genes inibidos foi discreta: 500 genes 6 hpi (Fig. 4.8C) e 283

genes 24 hpi, incluindo genes de regulação da mitose (Fig. 4.8D). Enquanto que a linhagem CS-B aumentou a quantidade de genes inibidos: 6 hpi foram somente 188 genes (Fig. 4.9C), mas 411 genes 24 hpi, incluindo regulação das quinases MAPK e JUN (Fig. 4.9D),

4.2.9 Síntese de RNA mitocondrial e rRNA não é inibida devido à grande quantidade de cópias de DNA e ao tamanho reduzido dos transcritos

Em seguida, analisamos a síntese de RNA ribossômico nos fibroblastos primários humanos. Para isso, nós colapsamos as aproximadamente 400 sequências de rDNA em uma única sequência e alinhamos todas as leituras a este *locus*, como recentemente descrito (ZENTNER et al., 2011), representando o rDNA responsável pelo transcrito policistrônico 45S pré-rRNA que será processada nas 3 subunidades 18S, 5,8S e 28S em humanos (GRUMMT, 2003). Devido à etapa de seleção de tamanho do cDNA amplificado (200 bp) para a biblioteca antes do sequenciamento, nós não tivemos quantidade suficiente da pequena subunidade de RNA ribossômico 5,8S.

Observamos que com pulso de 30 min de BrU, os fibroblastos primários sintetizam cerca de 13% de RNA ribossômico (Tabela 4.5). Após irradiação com luz UVC, essa quantidade aumenta para 35% em fibroblastos selvagens e 49% na linhagem CS-B, o que indica que rRNA não é muito inibido por essas doses de luz UVC e acaba por ter maior representação em relação ao RNA total nas células. Ao longo do tempo a porcentagem de rRNA diminuir e retorna ao nível da amostra não irradiada em XP-C e nos fibroblastos selvagens (com 10 J/m² a recuperação é maior do que com 20 J/m²), mas não recupera muito em CS-B (Tabela 4.5). A unidade de transcrição do rRNA humano possui cerca de 14 kbp e, assim, de acordo com a distribuição de Poisson para a dose de 10 J/m², cerca de 37% das cópias de rDNA (aproximadamente 140 cópias) não teriam nenhuma lesão. Isso explica porque não identificamos acúmulo de sinal na extremidade 5' dos transcritos de rRNA (Fig. 4.11A). Além disso, encontramos mais sinal dentro das subunidades 16S e 28S, indicando que em 30 min já é possível detectar processamento do pré-rRNA. Células XP-C apresentaram quantidade de rRNA destoante em relação às outras linhagens e por esse motivo o pico de UV na extremidade 5' dos genes agregados foi menor do que nas outras linhagens (Fig. 4.3B). Infelizmente não temos como afirmar se essa é uma característica peculiar da deficiência de XPC, sendo mais provável ser algum artefato durante a preparação da biblioteca destas amostras.

Tabela 4.1. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. Genes induzidos 6 hpi ou 24 hpi representados do lado esquerdo e genes inibidos 6 hpi ou 24 hpi no lado direito, com indicação de nome do gene, tamanho e razão comparado ao controle não irradiado.

Gene	(bp)	RPKM UV 6h	RPKM Ctrl	Razão 6h/Ctrl	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão 24h/Ctrl	Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão
BTG2	4066	41,35	1,17	35,25	GDF15	3019	10,79	0,79	13,59	C11orf41	131770	0,08	0,97	0,08	LOC100630923	12462	0,48	2,64	0,18
GDF15	3019	19,48	0,79	24,52	BTG2	4066	5,85	1,17	4,99	TMEM183A	16664	0,13	1,33	0,10	TM4SF1	8764	0,29	1,36	0,21
PMAIP1	4347	29,34	1,94	15,09	LOC643401	24110	4,39	0,98	4,50	TANC2	418170	0,32	2,96	0,11	TNFSF4	23602	0,18	0,74	0,25
LOC643401	24110	10,85	0,98	11,12	HERC6	64359	2,15	0,50	4,28	CDK14	501193	0,09	0,79	0,11	WFDC1	35050	0,29	1,07	0,27
GDNF	27004	8,98	0,87	10,28	IFIT3	13124	12,81	3,26	3,93	ST3GAL5	49887	0,07	0,60	0,11	E2F8	16898	0,15	0,54	0,29
TP53INP1	23416	13,75	1,42	9,68	PTX3	6838	5,92	1,52	3,89	SNORD62	4907	0,07	0,62	0,12	MIR548AC	273257	0,21	0,73	0,29
CDKN1A	10880	57,69	6,45	8,94	IFI6	6153	9,83	2,64	3,72	KIAA1267	195459	0,06	0,51	0,12	RFX8	77343	0,18	0,63	0,29
C21orf91	30420	7,46	0,85	8,75	MX1	38622	3,82	1,07	3,58	MGAT5	200363	0,17	1,40	0,12	HAS2	28360	0,57	1,89	0,30
AVP11	9835	12,25	1,48	8,30	CDKN1A	10880	22,56	6,45	3,50	KCNMA1	768219	0,13	0,92	0,14	ACTA2	56317	2,81	9,30	0,30
PMF1	27090	10,65	1,31	8,14	GDNF	27004	2,99	0,87	3,42	USP32	214896	0,24	1,69	0,14	PLCB1	752252	0,16	0,53	0,30
DYRK3	13662	8,25	1,04	7,94	MDM2	37242	18,96	6,10	3,11	PIK3CB	103955	0,10	0,67	0,14	KCNQ5	577003	0,23	0,74	0,31
ANKRA2	13487	4,80	0,61	7,89	SAT1	3053	6,15	2,01	3,06	SMYD3	758003	0,08	0,53	0,14	C1QTNF3	25409	0,18	0,57	0,31
C12orf5	38832	8,49	1,10	7,75	IFIT2	7328	7,09	2,32	3,05	NIPAL4	14704	0,09	0,63	0,14	AFF3	595322	0,71	2,07	0,34
PCNA	11670	13,54	1,85	7,33	FBXO32	43367	1,79	0,59	3,03	TNFSF4	23602	0,11	0,74	0,14	NIPAL4	14704	0,22	0,63	0,35
TICAM2	23838	3,71	0,51	7,27	DLX2	3313	2,34	0,78	2,99	LARGE	647355	0,09	0,63	0,15	PRR4	3628	0,20	0,57	0,35
SNAPC5	7481	4,01	0,56	7,20	TP53INP1	23416	4,11	1,42	2,90	FAM45	24642	0,10	0,70	0,15	SNX18	28828	1,68	4,61	0,36
SERTAD1	3524	8,48	1,24	6,86	EPSTI1	104256	1,56	0,54	2,87	NAV1	178653	0,35	2,37	0,15	MAGI2	1436517	0,32	0,87	0,37
DDB2	24277	4,29	0,63	6,77	XAF1	19809	4,68	1,64	2,85	AK5	277993	0,09	0,58	0,15	AK5	277993	0,22	0,58	0,38
FAS	25255	12,06	1,79	6,74	PAPPA	248530	3,38	1,24	2,73	MAGI2	1436517	0,13	0,87	0,15	C11orf41	131770	0,38	0,97	0,39
PHLDA3	3678	11,73	1,85	6,33	PARP9	36764	2,01	0,74	2,73	C3orf35	36021	0,11	0,69	0,15	ZNF367	32445	0,50	1,29	0,39
SAMD9	18511	4,51	0,72	6,26	IFIT1	11423	13,12	4,86	2,70	C16orf45	153792	0,11	0,70	0,16	KHDRBS3	190133	0,56	1,43	0,39
CCDC90B	24876	6,55	1,05	6,23	EREG	23618	9,29	3,45	2,69	XYLT1	368558	0,62	3,96	0,16	LMOD1	50133	1,22	3,10	0,39
FBXO22	31409	6,11	0,99	6,17	DDB2	24277	1,70	0,63	2,68	ANGPT1	248545	0,31	1,99	0,16	KCNN2	134182	0,88	2,22	0,40
PPM1D	66097	5,48	0,91	6,03	SP110	56800	1,39	0,53	2,64	ARHGAP32	227139	0,10	0,61	0,16	DIAPH2	915936	0,27	0,66	0,40
ASNS	20426	3,40	0,57	6,01	DUSP4	17689	1,53	0,58	2,63	SIPA1L1	210079	0,44	2,73	0,16	AKAP6	503790	1,44	3,59	0,40

Tabela 4.2. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em XPC. Genes induzidos 6 hpi ou 24 hpi representados do lado esquerdo e genes inibidos 6 hpi ou 24 hpi no lado direito, com indicação de nome do gene, tamanho e razão comparado ao controle não irradiado.

Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão
BTG2	4066	36,24	0,89	40,81	BTG2	4066	28,25	0,89	31,82	C11orf41	131770	0,12	1,11	0,10	C11orf41	131770	0,08	1,11	0,07
TP53INP1	23416	9,46	0,87	10,93	TP53INP1	23416	13,13	0,87	15,17	ZNF536	185638	0,08	0,74	0,11	GPC6	1181196	0,05	0,62	0,08
C12orf5	38832	8,19	0,81	10,06	TP53I3	7783	8,27	0,82	10,08	GPC6	1181196	0,07	0,62	0,11	KIAA1199	172288	1,19	10,21	0,12
PMAIP1	4347	22,95	2,51	9,16	BBC3	11945	6,93	0,73	9,51	CSMD2	651835	0,19	1,55	0,12	ZNF367	32445	0,26	1,96	0,13
DYRK3	13662	9,41	1,16	8,14	SAT1	3053	17,14	1,81	9,47	WNT5B	30157	0,37	3,13	0,12	KCNQ5	577003	0,17	1,29	0,13
MDM2	37242	38,67	4,82	8,02	MDM2	37242	40,46	4,82	8,40	MGAT5	200363	0,11	0,95	0,12	NPR3	81088	0,28	2,01	0,14
GADD45A	3162	40,57	5,08	7,99	DYRK3	13662	9,61	1,16	8,31	ODZ4	787368	0,08	0,64	0,12	THSD4	641935	0,31	2,15	0,14
SESN2	23040	11,94	1,66	7,20	SERTAD1	3524	7,47	1,02	7,35	LOC100527964	5019	0,11	0,91	0,12	CSMD2	651835	0,24	1,55	0,16
PPM1D	66097	7,44	1,05	7,09	CDKN1A	10880	65,55	9,18	7,14	KIAA1199	172288	1,27	10,21	0,12	PRR4	3628	0,08	0,53	0,16
TUBE1	16892	3,66	0,53	6,92	RETSAT	12744	3,62	0,56	6,52	TIAM2	167435	0,07	0,58	0,13	PAQR4	4144	0,11	0,67	0,16
CDKN1A	10880	63,42	9,18	6,91	GNPDA1	12387	3,76	0,58	6,46	TLN2	197320	0,15	1,19	0,13	TLN2	197320	0,19	1,19	0,16
ZMAT3	54646	7,57	1,12	6,75	NR4A2	8344	3,40	0,54	6,33	SRGAP2	121584	0,16	1,21	0,13	ODZ2	979320	0,28	1,65	0,17
FAS	25255	15,40	2,29	6,74	MYLIP	19162	4,23	0,69	6,16	SIPA1L1	210079	0,33	2,49	0,13	SLC4A4	384802	0,13	0,76	0,17
SERTAD1	3524	6,84	1,02	6,73	SOD2	14205	7,01	1,20	5,83	THSD4	641935	0,29	2,15	0,14	DPF3	224150	0,31	1,80	0,17
TNFRSF10B	49053	9,37	1,43	6,55	TSPYL2	6187	4,11	0,71	5,82	GRAMD1B	96991	0,25	1,84	0,14	ST7-OT3	16464	0,20	1,14	0,17
RPS27L	4203	29,96	4,65	6,44	C12orf45	8408	4,46	0,78	5,73	CDK14	501193	0,14	0,97	0,14	SLC8A1	400290	0,23	1,28	0,18
CHAC1	3082	3,36	0,53	6,40	ABHD4	14119	3,65	0,66	5,52	ST7-OT3	16464	0,16	1,14	0,14	CDK14	501193	0,18	0,97	0,18
TNFRSF10D	28437	13,73	2,21	6,21	DRAM1	46297	6,70	1,22	5,51	SH3RF3	516211	0,10	0,65	0,15	OXTR	19206	1,69	9,33	0,18
SNAPC5	7481	5,34	0,86	6,20	BDKRB1	8554	3,68	0,67	5,50	TANC2	418170	0,33	2,23	0,15	TIAM2	167435	0,11	0,58	0,18
PTP4A1	11570	29,58	4,79	6,17	PPM1D	66097	5,61	1,05	5,35	NAV2	770877	0,33	2,24	0,15	UHRF1	52656	0,70	3,73	0,19
C12orf45	8408	4,78	0,78	6,14	RNF19B	28237	4,16	0,78	5,33	KCNQ5	577003	0,20	1,29	0,15	SH3RF3	516211	0,13	0,65	0,20
CSDA	24278	15,61	2,55	6,12	C12orf5	38832	4,28	0,81	5,26	AGAP1	637712	0,12	0,77	0,16	NCALD	438366	0,15	0,73	0,20
FBXO22	31409	7,76	1,38	5,62	TNFRSF10B	49053	7,42	1,43	5,19	NBPF14	22207	0,26	1,64	0,16	NAIP	56632	0,28	1,40	0,20
PCNA	11670	19,40	3,46	5,61	SESN2	23040	8,55	1,66	5,16	NCALD	438366	0,12	0,73	0,16	E2F8	16898	0,19	0,96	0,20
TOB1	5753	20,17	3,76	5,37	BHLHE40	5769	10,98	2,13	5,15	C14orf49	58343	0,12	0,77	0,16	ADAMTS6	333142	0,59	2,91	0,20

Tabela 2.3. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 10 J/m² de luz UVC em fibroblastos humanos deficientes em CSB. Genes induzidos 6 hpi ou 24 hpi representados do lado esquerdo e genes inibidos 6 hpi ou 24 hpi no lado direito, com indicação de nome do gene, tamanho e razão comparado ao controle não irradiado.

Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão
BTG2	4066	23,64	1,33	17,71	BTG2	4066	53,58	1,33	40,15	ST7-OT3	16464	0,07	0,72	0,10	LOC100507254	35397	0,06	0,56	0,11
PCNA	11670	8,19	0,81	10,11	GDF15	3019	17,65	0,59	29,69	PRR4	3628	0,11	0,59	0,18	KIAA1199	172288	1,18	10,83	0,11
GDF15	3019	5,67	0,59	9,53	AKR1B1	16782	24,83	1,00	24,90	LGR5	144809	0,25	0,89	0,28	COL8A1	157705	1,59	13,92	0,11
PHLDA3	3678	7,94	1,12	7,10	HMOX1	13148	24,50	1,42	17,31	LOC727896	3409	0,35	1,23	0,29	LARGE	647355	0,21	1,70	0,12
MRPL49	5187	3,86	0,56	6,92	DYRK3	13662	16,96	0,98	17,29	GCNT4	3436	0,41	1,41	0,29	B3GALT2	7884	0,21	1,55	0,13
FAM43A	3145	6,21	0,96	6,46	PCNA	11670	13,81	0,81	17,04	SIPA1L2	117532	0,23	0,77	0,29	C5orf3	247629	0,15	1,10	0,14
POLR3GL	14152	3,68	0,57	6,41	AVPI1	9835	9,73	0,58	16,69	TANC2	418170	1,01	3,32	0,30	LBH	28503	2,40	16,38	0,15
PMAIP1	4347	9,74	1,54	6,34	SAT1	3053	30,79	1,91	16,14	C3orf35	36021	0,26	0,85	0,31	PLCB4	411762	0,95	6,44	0,15
CYP1B1	8578	19,07	3,09	6,17	POLG2	19283	7,95	0,51	15,57	ZNF670-									
PRDX5	3736	4,16	0,71	5,86	AKR1C1	14705	10,94	0,72	15,24	ZNF695	20235	1,30	4,23	0,31	ITGBL1	263829	0,65	4,37	0,15
CDC42EP2	7612	5,18	0,89	5,82	PMAIP1	4347	22,22	1,54	14,46	NCOA1	186225	0,27	0,86	0,31	DKK2	114495	0,35	2,34	0,15
POLR2A	30238	5,23	0,92	5,66	SLC31A2	13185	9,28	0,68	13,66	SEMA3D	126376	0,23	0,73	0,32	AKAP6	503790	0,43	2,87	0,15
GADD45A	3162	41,83	7,69	5,44	C9orf47	5280	7,80	0,59	13,18	SLC16A7	92283	0,38	1,18	0,32	ADAMTSL1	436869	0,37	2,46	0,15
LOC100630923	12462	5,82	1,07	5,44	GEM	13063	9,72	0,81	11,97	NBEA	730451	0,20	0,62	0,33	RIMS1	516196	0,27	1,82	0,15
SNHG15	3633	3,18	0,59	5,38	TP53INP1	23416	30,86	2,75	11,22	PARD3B	1074371	0,32	0,96	0,33	LMOD1	50133	0,23	1,52	0,15
RPS11	3311	25,18	4,81	5,23	PPM1D	66097	11,96	1,09	11,02	UTRN	561298	0,76	2,26	0,34	C11orf87	7048	0,19	1,22	0,15
OAZ1	3968	19,38	3,71	5,23	E2F7	44335	12,63	1,18	10,74	LARGE	647355	0,58	1,70	0,34	SLC8A1	400290	0,17	1,11	0,16
C12orf5	38832	5,55	1,06	5,21	SNHG15	3633	5,81	0,59	9,83	SIPA1L1	210079	0,62	1,80	0,34	PDE1C	545752	0,40	2,50	0,16
SPHK1	3252	3,34	0,65	5,13	RAP2B	6235	28,95	2,98	9,72	PDE11A	485090	0,20	0,59	0,35	NEK7	165441	2,77	17,04	0,16
ISCU	6867	10,09	1,99	5,07	C21orf91	30420	6,93	0,73	9,54	GPR75	7121	0,55	1,58	0,35	ANGPT1	248545	0,46	2,79	0,17
FBXO22	31409	4,84	0,96	5,06	NFKBIA	3245	12,02	1,30	9,25	TBC1D5	585587	0,32	0,89	0,36	RHOBTB1	132001	0,23	1,39	0,17
RPL18A	3394	12,17	2,45	4,97	DIMT1	15378	8,89	0,96	9,23	GAB2	202533	0,24	0,69	0,36	PARD3B	1074371	0,16	0,96	0,17
RPL13	6173	11,71	2,36	4,96	PHLDA3	3678	10,09	1,12	9,02	MAGI1	684604	0,45	1,26	0,36	KIF26B	548142	0,20	1,17	0,17
HEXIM1	4785	3,77	0,76	4,94	MRPL49	5187	5,02	0,56	9,00	LOC283624	6822	1,49	4,13	0,36	RCAN2	271338	0,15	0,88	0,17
TCEB2	5883	3,25	0,66	4,92	CSRNP1	11761	5,77	0,64	8,97	RNF150	267892	0,66	1,82	0,36	KIT	82787	0,36	2,08	0,17
										SBF2	515541	0,55	1,52	0,36	HMCN1	456403	0,46	2,61	0,18

Tabela 4.4. Lista dos 25 genes mais induzidos ou inibidos após 20 J/m² de luz UVC em fibroblastos humanos selvagens. Genes induzidos 6 hpi ou 24 hpi representados do lado esquerdo e genes inibidos 6 hpi ou 24 hpi no lado direito, com indicação de nome do gene, tamanho e razão comparado ao controle não irradiado.

Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV	RPKM Ctrl 6h	Razão	Gene	(bp)	RPKM UV 24h	RPKM Ctrl	Razão
POLG2	19283	16,51	0,56	29,34	GDF15	3019	33,66	0,79	42,36	ST7-OT3	16464	0,05	1,49	0,03	TNFSF4	23602	0,12	0,74	0,16
CDKN1A	10880	66,22	2,71	24,47	BTG2	4066	26,07	1,17	22,23	TACR1	153056	0,03	0,56	0,05	NIPAL4	14704	0,11	0,63	0,17
PHLDA3	3678	22,81	1,28	17,76	SAT1	3053	25,62	2,01	12,75	NPR3	81088	0,08	0,68	0,12	WFDC1	35050	0,21	1,07	0,19
PMAIP1	4347	39,94	2,37	16,83	HMOX1	13148	12,18	0,98	12,38	KCNQ5	577003	0,15	1,19	0,12	AK5	277993	0,12	0,58	0,20
SNAPC5	7481	9,62	0,60	15,95	IFIT2	7328	24,91	2,32	10,72	CEP128	443064	0,15	1,15	0,13	C11orf41	131770	0,20	0,97	0,21
TP53INP1	23416	12,87	1,01	12,74	SAMD9	18511	6,89	0,72	9,57	STX16- NPEPL1	14536	0,08	0,58	0,13	AKAP6	503790	0,75	3,59	0,21
ANKRA2	13487	7,19	0,57	12,56	TP53INP1	23416	12,39	1,42	8,72	LRP8	85781	0,16	1,12	0,14	C1QTNF3	25409	0,13	0,57	0,22
ISCU	6867	16,20	1,50	10,78	GNDF	27004	7,40	0,87	8,47	POPDC3	22084	0,18	1,21	0,15	ACTA2	56317	2,10	9,30	0,23
C12orf5	38832	8,57	0,82	10,48	LOC643401	24110	7,69	0,98	7,88	SCAPER	535691	0,08	0,55	0,15	TANC2	418170	0,67	2,96	0,23
HBEGF	13761	8,74	0,85	10,23	PMF1	27090	9,97	1,31	7,62	LOC647946	545072	0,12	0,77	0,16	ACTG1	7631	0,47	2,05	0,23
FAM53C	12195	8,88	0,88	10,12	DYRK3	13662	7,50	1,04	7,21	SMAD9	75442	0,18	1,10	0,16	PARD3B	1074371	0,31	1,36	0,23
FBXO22	31409	10,27	1,04	9,90	IFIT3	13124	23,30	3,26	7,14	MURC	9838	0,08	0,51	0,16	CDK14	501193	0,18	0,79	0,23
CDC42EP2	7612	12,91	1,31	9,84	CDKN1A	10880	44,13	6,45	6,84	RSRC1	434685	0,12	0,74	0,17	KCNQ5	577003	0,17	0,74	0,23
DDB2	24277	5,87	0,61	9,67	PMAIP1	4347	12,86	1,94	6,61	XYLT1	368558	0,38	2,27	0,17	LMOD1	50133	0,73	3,10	0,23
TNFRSF10B	49053	10,98	1,15	9,51	APOL2	13746	3,56	0,54	6,54	PODXL	56356	0,14	0,78	0,18	CDH6	135492	0,17	0,73	0,24
SERTAD1	3524	15,38	1,67	9,22	IFI6	6153	17,15	2,64	6,49	ADAMTSL1	436869	0,27	1,54	0,18	RFX8	77343	0,15	0,63	0,24
MRPL49	5187	7,86	0,86	9,17	FBXO32	43367	3,82	0,59	6,47	PLEK2	25129	0,09	0,52	0,18	ANGPT1	248545	0,47	1,99	0,24
CCDC90B	24876	9,44	1,06	8,92	MX1	38622	6,89	1,07	6,47	RTKN2	75514	0,14	0,77	0,18	MIR548AC	273257	0,18	0,73	0,24
LOC401093	7011	6,07	0,68	8,88	SLC31A2	13185	3,37	0,52	6,46	MIR548AC	273257	0,13	0,71	0,18	SYT16	105887	0,14	0,58	0,24
CDKN2B	6411	4,96	0,56	8,79	SAMD9L	18313	5,11	0,81	6,32	LOC728407	117409	0,12	0,63	0,19	NAV3	381722	1,77	7,17	0,25
SLC9A1	56152	5,18	0,59	8,76	EREG	23618	21,61	3,45	6,27	CDK14	501193	0,22	1,14	0,19	COL11A1	232030	3,41	13,85	0,25
PMF1	27090	8,94	1,02	8,76	GEM	13063	3,75	0,60	6,25	ARHGAP19	70501	0,14	0,73	0,19	VEPH1	243884	0,39	1,59	0,25
PLK3	5632	7,19	0,83	8,62	BHLHE40	5769	6,88	1,11	6,19	VEPH1	243884	0,38	1,96	0,19	TBC1D5	585587	0,17	0,67	0,25
IL6	4856	18,69	2,19	8,54	MDM2	37242	36,01	6,10	5,91	AK5	277993	0,15	0,78	0,20	LOC100527964	5019	0,22	0,85	0,25
PLK2	6157	45,83	5,41	8,48	MYD88	4544	3,89	0,67	5,85	ITGA6	78868	0,29	1,43	0,20	HAS2	28360	0,48	1,89	0,25

Tabela 4.5. Informações do sequenciamento por Bru-Seq de cada amostra e porcentagem de RNA ribossômico e mitocondrial. Indicado total de leituras sequenciadas por amostra, além de porcentagem de leituras mapeadas de diferentes grupos de RNA (ribossômico, mitocondrial ou outros).

Amostra	Contagem de leituras	Leituras de rRNA	Leituras de RNA mitocondrial	Outras leituras mapeadas
Fibroblasto selvagem oJ/m ²	52,744,856	13 %	2,6 %	74 %
Fibroblasto selvagem UV 2oJ/m ² 0h	44,983,741	36 %	4,8 %	50 %
Fibroblasto selvagem UV 2oJ/m ² 2h	53,977,732	23 %	4,1 %	61 %
Fibroblasto selvagem UV 2oJ/m ² 6h	53,212,455	26 %	3,7 %	59 %
Fibroblasto selvagem UV 2oJ/m ² 24h	58,490,073	17 %	1,3 %	70 %
Fibroblasto selvagem oJ/m ²	78,636,211	14 %	1,7 %	73 %
Fibroblasto selvagem UV 1oJ/m ² 0h	57,220,010	34 %	3,6 %	51 %
Fibroblasto selvagem UV 1oJ/m ² 2h	61,789,725	20 %	3,1 %	64 %
Fibroblasto selvagem UV 1oJ/m ² 6h	67,828,411	22 %	2,5 %	64 %
Fibroblasto selvagem UV 1oJ/m ² 24h	54,733,786	10 %	1,4 %	77 %
XP-C oJ/m ²	68,946,088	25 %	1,4 %	62 %
XP-C UV1oJ/m ² 0h	71,352,750	76 %	1,2 %	13 %
XP-C UV1oJ/m ² 2h	69,844,252	56 %	1,7 %	29 %
XP-C UV1oJ/m ² 6h	99,798,626	37 %	2,2 %	50 %
XP-C UV1oJ/m ² 24h	70,632,903	27 %	1,3 %	60 %
CS-B oJ/m ²	68,035,861	12 %	2,8 %	73 %
CS-B UV1oJ/m ² 0h	74,400,603	49 %	4 %	38 %
CS-B UV1oJ/m ² 2h	67,394,196	48 %	4,3 %	39 %
CS-B UV1oJ/m ² 6h	71,520,883	40 %	4,8 %	45 %
CS-B UV1oJ/m ² 24h	103,818,020	29 %	2 %	58 %

Em seguida, analisamos RNA produzidos pela mitocôndria. Em humanos, o genoma mitocondrial consiste em 16,57 kbp codificando 8 mRNAs, 2 rRNAs e 22 tRNAs (ASIN-CAYUELA; GUSTAFSSON, 2007). São três diferentes inícios de transcrição, produzindo 3 transcritos policistrônicos: promotor HSP1 produz rRNA 12S e 16S na fita pesada; promotor HSP2 produz transcrito percorrendo toda fita pesada e o promotor LSP na fita leve produz um mRNA e RNA antissenso (MERCER et al., 2011).

Nós observamos que cerca de 2% do RNA em fibroblasto não irradiados corresponde a RNA mitocondrial (Tabela 4.5), sendo a maior parte correspondente a transcrição dos rRNA 12S e 16S (Fig. 4.11D). Da mesma forma que com rRNA, já observamos processamento do

RNA policistrônico e não observamos pico de UV na extremidade 5' do gene, devido ao comprimento do genoma mitocondrial e à grande quantidade de cópias encontradas por célula. Fibroblastos humanos possuem cerca de 1600 cópias de mtDNA em homens e 1900 cópias em mulheres, distribuídos entre 2 a 8 cópias por mitocôndria (LEGROS et al., 2004). A porcentagem de RNA mitocondrial também aumenta após irradiação com luz UVC, porém em menor grau que rRNA (170% para rRNA e 110% para mtRNA em fibroblastos selvagens após 10 J/m²) (Tabela 4.5). Diferente dos fibroblastos selvagens, em células CS-B, em que a recuperação da transcrição em todo genoma foi comprometida, a quantidade de RNA mitocondrial aumentou até 6 hpi e reduziu somente 24 hpi (Fig. 4.11 E), quando maior porcentagem de RNA diferente de rRNA foi mapeada, sugerindo que a diferença tanto em rRNA e RNA mitocondrial após luz UVC é dependente da recuperação da transcrição em todo genoma.

Também analisamos a síntese de outros RNAs não codificantes. *MALAT1* foi o gene mais transcrito em nossos experimentos, com 321 RPKM em fibroblastos selvagens não irradiados (Fig. 4.11F). Conhecido também como NEAT2 (*noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2*), está associado à expressão de genes associados à metástase, regulando positivamente a mobilidade celular (GUTSCHNER et al., 2013; TANO et al., 2010). De acordo com a análise funcional de genes inibidos por UVC em relação a mobilidade celular, MALAT teve sua síntese inibida apesar de ser um gene curto (apenas 8,7 kbp), mas ainda assim manteve síntese expressiva com 165 RPKM (Fig. 4.11F).

Devido à limitação da técnica com uma etapa de seleção de tamanho do cDNA amplificado (200 bp) para a biblioteca antes do sequenciamento, não conseguimos quantificar microRNAs (miR) a não ser que estivessem imersos em gene com comprimento maior. Desses, identificamos o gene *MIR143HG* (*miRNA 143 host gene*) com redução da síntese de RNA 24 hpi após luz UVC, contendo miR-143 e miR-145 (Fig. 4.11B, C). Entretanto, esses dois miRNAs são regulados positivamente após danos no DNA, de maneira dependente de p53 (SUZUKI et al., 2009). Eles são considerados supressores de tumor, por regularem negativamente a apoptose e proliferação celular, além de estarem reprimidos em alguns tumores (SACHDEVA; MO, 2010; ZHANG et al., 2010).

Figura 25. Análise da recuperação de transcrição, após luz UVC, de RNAs não codificantes. Os mapas do genoma mitocondrial e da unidade transcricional de rDNA são representadas acima dos gráficos. **A)** RNA ribossômico em fibroblasto selvagem. **B)** Exemplo de microRNA em fibroblasto selvagem. **C)** Mesmo gene de B em célula deficiente em CSB, indicando maior repressão 24 hpi. **D)** RNA mitocondrial em fibroblasto selvagem. **E)** RNA mitocondrial em célula deficiente em CSB, indicando atraso para voltar aos níveis basais de síntese de RNA. **F)** Gene mais transcrito em fibroblastos é *MALAT1*, que transcreve um RNA não codificante.

Dessa forma, nossos resultados significariam uma contradição com dados da literatura, já que esses miRNA deveriam aumentar e não diminuir após luz UVC. Porém, a regulação de p53 é pós-transcricional, melhorando a eficiência de maturação através de uma

interação direta com o complexo de Drosha (SUZUKI et al., 2009). Com isso, apesar da redução de síntese de RNA de *MIR143HG* após irradiação com luz UVC, a quantidade de miRNAs maduros ainda pode aumentar devido à estabilização de p53 e aumento da eficiência de maturação dos miRNAs. Entretanto, já foi descrito que em melanócitos, miR-145 é reprimido em 15 vezes após irradiação com luz UV simulando luz solar e responsável pela regulação da pigmentação (DYNOODT et al., 2012), o que poderia sugerir que a redução da síntese que observamos após luz UVC – principalmente em CS-B (Fig. 4.11C) - poderia sim resultar em redução do miR-145 maduro.

4.2.10 Extremidades 3' de genes longos são reparadas mais lentamente, porém reparo de DNA não explica completamente a eficiência de recuperação de transcrição após luz UVC

Se a recuperação da transcrição depende do reparo acoplado à transcrição, devemos esperar que as lesões fossem retiradas primeiramente no início do gene (extremidade 5'). Assim, medimos o reparo de fotoprodutos comparando a extremidade 5' com a extremidade 3' em genes específicos, através do ensaio de XL-PCR. Com esse ensaio desenhamos *primers* para o começo ou para o final do gene, resultado em produtos de amplificação maiores que 10 kbp para aumentar a sensibilidade do ensaio. Através da distribuição de Poisson, conseguimos estimar quantas lesões permanecem na região estudada através de quanto foi amplificado (FURDA et al., 2012).

Escolhemos 3 genes com perfis de recuperação da transcrição distintos: *ATR* (129 kbp), com recuperação mediana (Fig. 4.12A); *PAPPA* (248 kbp), gene induzido por luz UVC e recuperação acima da mediana (Fig. 4.12B); e *SLIT2* (365 kbp), com recuperação abaixo da mediana (Fig. 4.12C). Como controle negativo, selecionamos *primers* para uma região intergênica não transcrita próxima ao gene *ATR* no cromossomo 3. Além disso, os ensaios de XL-PCR foram realizados em fibroblastos XP-C, de modo com que o reparo quantificado seja referente ao acoplado à transcrição.

Figura 26. Genes com eficiências de recuperação da transcrição distintas após 10 J/m^2 de luz UVC, através de Bru-Seq. A) Gene *ATR* - 129 kbp (recuperação mediana). B) Gene *SLIT2* - 365 kbp (recuperação lenta). C) Gene *PAPP* - 248 kbp (recuperação rápida – alvo de p53 e induzido por luz UVC). *ATR* com transcrição no sentido da direita para a esquerda.

Após irradiação com 10 J/m^2 , observamos que 6 hpi a extremidade 3', perto do sítio de início de transcrição (TSS), teve reparo mais rápido que a extremidade 5'(END) nos 3 genes, enquanto que no controle negativo - não transcrito - não foi observado reparo de DNA (Fig. 4.13A). Porém, apesar dos genes apresentarem diferenças na eficiência de recuperação da transcrição, não houve diferença estatística do reparo da extremidade 5' (END) entre os três genes. Após 24 hpi, a extremidade 5' (END) dos três genes aumenta taxa de reparo de DNA e apresenta remoção de dímeros de pirimidina no nível da extremidade 3'(TSS) (Fig. 4.13A).

Figura 27. Quantificação de reparo de DNA acoplado à transcrição em genes específicos, após 10 J/m^2 de luz UVC, através de XL-PCR ATR em fibroblastos XP-C. **A)** Comparação entre reparo da extremidade 5' (TSS) ou 3' (END) de genes com eficiência diferente na recuperação da transcrição após luz UVC. Extremidade 3' de genes longos são reparados mais lentamente, porém a diferença de reparo não explica completamente a eficiência de recuperação de transcrição após luz UVC. **B)** Comparação de reparo de DNA após irradiação com luz UVC em genes com diferentes expressões gênicas. Cálculo de lesões remanescentes através da distribuição de Poisson (Mais detalhes em Materiais e Métodos) através de médias de quadruplicatas de 2 extrações independentes de DNA. Estatística com Two-way ANOVA: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Com o intuito de investigar se o nível de expressão gênica é determinante na eficiência de reparo de DNA, selecionamos mais 3 genes: *ANXA2* (50 kbp – 27 RPKM, inibido a 18 RPKM 24 hpi); *DRAM1* (46 kbp – 1,2 RPKM induzido a 6 RPKM 24 hpi) e *LECT1* (condromodulina 1 ou quimiotaxina derivada de leucócito) (36 kbp – 0 RPKM). Enquanto que *LECT1*, o gene não transcrito em fibroblasto apresentou reparo quase nulo da mesma forma que a região intergênica, *DRAM1* e *ANXA1* apresentaram reparo na mesma taxa que a extremidade 5'(TSS) dos outros três genes (Fig. 4.13B).

A quantidade de lesões que permanecem na extremidade 5' dos genes permanece constante mesmo 24 hpi devido ao fato de que com XL-PCR estamos quantificando lesões nas duas fitas (senso e antissenso). Como temos a quantificação de reparo de porções não transcritas (Região intergênica e *LECT1*), podemos normalizar o reparo dos outros genes para determinar o reparo somente na fita transcrita. Dessa forma observamos que após 6 hpi a extremidade 5' da fita senso de todos genes já repararam praticamente todas as lesões (Fig. 4.14). Agora, analisando somente a fita senso, a diferença entre o reparo de DNA entre 5'(TSS) e 3' (END) é maior, mas ainda assim não foi detectada diferença estatística entre os diferentes genes, apesar da remoção de dímeros de *SLIT2* ser ligeiramente menor que a de *PAPPA*. Dessa forma, com este conjunto de resultados, somente o reparo acoplado à transcrição parece não explicar a diferença do perfil de recuperação da síntese de RNA encontrado entre genes longos, já que o gene *SLIT2* com atraso na recuperação da transcrição apresentou reparo de DNA por TCR estatisticamente igual a genes com recuperação da síntese de RNA mais rápida, como *ATR* e *PAPPA* (Fig. 4.12).

Figura 28. Quantificação de reparo de DNA acoplado à transcrição apenas da fita transcrita em genes específicos, após 10 J/m² de luz UVC, através de XL-PCR ATR em fibroblastos XP-C. Mesmos experimentos da figura 4.13, porém com normalização para observar o reparo apenas na fita transcrita (normalização com valor de reparo de DNA de porções não transcritas – *LECT1* e região intergênica). Estatística com Two-way ANOVA: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

4.3 DISCUSSÃO

Através da técnica de sequenciamento de nova geração Bru-Seq conseguimos analisar em escala genômica a síntese de RNA individual de genes. Verificamos que irradiação com luz UVC inibiu a elongação da síntese de RNA, mas não a iniciação da transcrição e que essa inibição é maior em genes com maior comprimento. Enquanto fibroblastos primários selvagens recuperaram completamente a síntese de RNA 24 hpi, células XP-C apresentaram complicações somente em genes longos, enquanto que células CS-B apresentaram deficiência inclusive em genes mais curtos. Observamos ainda que genes induzidos após luz UVC ou altamente expressos não apresentaram melhor eficiência na recuperação da transcrição e que a remoção de dímeros de pirimidina não é suficiente para explicar diferenças na eficiência de recuperação de transcrição.

A probabilidade de bloqueio da transcrição em um gene é proporcional ao comprimento do gene e à dose de luz UVC. Nossos dados corroboram a importância do tamanho dos genes para a resposta ao dano no DNA. Genes pró-sobrevivência como *MDM2*, *BCL2L1* e *PPMD1* apresentam tamanho quase 10 vezes maior do que genes pró-apoptóticos como *PUMA*, *BAX* e *BAK1*, apesar de possuírem mRNA estatisticamente do mesmo tamanho (MCKAY et al., 2004). O resultado dessa diferença é que os genes pró-apoptóticos não são inibidos por luz UV, enquanto os genes pró-sobrevivência – bem maiores – são inibidos por doses maiores que 10 J/m^2 de luz UVC, funcionando como dosímetros moleculares (MCKAY et al., 2004). Essa é uma evidência de como, ao longo da evolução, o tamanho de introns também foi selecionado por possibilitar um mecanismo regulatório que age no nível de elongação da transcrição.

A síntese total de RNA em célula selvagem após por 5 J/m^2 luz UVC e pulso de 30 min com uridina tritiada é descrita como inibida a 60% da síntese em células não irradiadas (ROCKX et al., 2000). Após 6 hpi, o nível de RNA total recupera e atinge 120%. Entretanto, medindo RNA não é possível determinar que tipo de RNA é recuperado. Com nossos dados, com 10 J/m^2 , observamos que genes maiores que 40 kbp ainda não recuperaram a transcrição após luz UVC e podemos observar ainda grande quantidade de rRNA. Somente 24 hpi após luz UVC, genes com até 150 kbp conseguem recuperar sua transcrição, mas genes maiores como *SLIT2* (365 kbp) ainda não recuperou completamente 24 hpi em células selvagens. A correlação entre reparo de DNA e recuperação de transcrição após luz UVC não

é perfeita (LJUNGMAN, 1999; MAYNE; LEHMANN, 1982; VAN HOFFEN et al., 1999). Células com capacidades de reparo distintas, como uma linhagem XP-C e outra XP-V, apresentam recuperação da transcrição similar (recuperação parcial em comparação com uma linhagem selvagem) (MAYNE; LEHMANN, 1982). Nossos dados corroboram que células XP-C apresentam um atraso na recuperação da transcrição após luz UVC e mostra que esse atraso afeta genes longos em tempos maiores como 24 hpi. Já células CS-B, como bem descrito na literatura, não são capazes de recuperam a síntese de RNA (MAYNE; LEHMANN, 1982; ROCKX et al., 2000). Nós observamos apenas discreta melhora 6 hpi, mas ainda assim genes maiores que 30 kbp não conseguirão recuperar sua transcrição mesmo 24 hpi.

Mas será que é somente a deficiência em reparo acoplado à transcrição que prejudica a recuperação em célula CS-B? Afinal, o que acontece com a RNA polimerase bloqueada? Duas possibilidades explicariam como a maquinaria de reparo teria acesso à lesão que bloqueio a RNA polimerase: 1) Complexo de transcrição é desfeito e RNA polimerase é degradada ou tem que voltar ao sítio de iniciação; 2) RNA polimerase desliza para trás, dá acesso ao reparo e continua de onde parou após a remoção do dímero (HANAWALT; SPIVAK, 2008). *In vitro*, foi observado que o transcrito bloqueado é clivado em cerca de 10 nucleotídeos na presença de TFIIIS e aumenta de tamanho na presença de NTPs, indicando que a RNA polimerase pode deslizar para trás e continuar de onde parou (DONAHUE et al., 1994). A RNA polimerase II (RNAPII) é encontrada na célula em duas formas, hipofosforilada (IIa) quando é recrutada ao sítio de iniciação da transcrição ou hiperfosforilada (IIo), quando entra no complexo de elongação da transcrição. Evidências com estudos em células indicam que a após a luz UVC, a forma IIo é reduzida por degradação via proteassomo, enquanto que a forma IIa é mais fosforilada, transformando-se na forma IIo (MCKAY et al., 2001). De forma importante, a degradação da RNAPII bloqueada (IIo) seria dependente da proteína CSB e, dessa forma, o problema não seria só reparo de DNA, mas a persistência da RNAPII bloqueada. Em células XP-D-CS (com sobreposição clínica de Xeroderma Pigmentosum e Síndrome de Cockayne) é encontrada pior recuperação de transcrição após luz UVC em comparação com uma célula XP-D, apesar da mesma capacidade de remoção de dímeros (VAN HOFFEN et al., 1999). Da mesma forma, células mutadas em UVSSA - também deficientes em TCR-NER - apresentam deficiência na estabilização de CSB, mas conseguem prevenir bloqueio prolongado de RNAPII e apresentam

sensibilidade mais leve à irradiação com luz UVC (SCHWERTMAN et al., 2012; ZHANG et al., 2012). UVSSA também foi relacionada a uma nova forma de ubiquitinação de Ilo de RNAPII (somente após luz UVC e não com peróxido de hidrogênio) que não está relacionada à degradação da polimerase, sendo sugerido que essa modificação poderia ser responsável pelo deslize para trás da RNAPII frente à lesão (NAKAZAWA et al., 2012).

Outra possibilidade para explicar a recuperação de síntese de RNA após luz UVC seria transcrição translesão. Estudos em levedura observaram o fenômeno em frequência baixa, mas relatam maior sensibilidade de mutante na RNA polimerase no sítio identificado como responsável pela síntese translesão (WALMACQ et al., 2012), porém com Bru-Seq em células humanas nós observamos permanência do bloqueio da RNAPII por horas, o que faria da translesão na transcrição um evento muito raro e com menor importância. A opção de deslize para trás ou regressão da RNAPII frente a lesões seria preferível em genes de mamíferos, que são muito maiores do que genes de procariotos, em comparação com a opção de degradação de RNAPII. Seria uma surpresa se o RNA parcialmente transcrito fosse abortado toda vez que RNAPII encontrasse um dano em genes longos como no gene da distrofina, o maior gene humano com 2,8 Mbp, que demora cerca de 16 horas para completar a transcrição (TENNYSON; KLAMUT; WORTON, 1995) . Apesar de nossa técnica não conseguir discriminar entre essas diferentes possibilidades, observamos que a recuperação da transcrição em genes maiores que 100 kbp não é constante ao longo do tempo. Em fibroblastos XP-C – que contam apenas com reparo acoplado à transcrição – se a eficiência de recuperação nas primeiras 6 hpi fosse mantida, genes de 100 kb teriam recuperação completa após 15 hpi, porém observamos que mesmo após 24 hpi esses genes ainda não recuperaram completamente a síntese de RNA (Fig. 4.3E). Esse fato sugere que TCR-NER é menos eficiente ao longo do tempo, o que seria compatível com a ideia de que RNAPII bloqueada são degradadas e uma nova RNAPII recomeça síntese de RNA desde o começo. Com taxa de transcrição de aproximadamente de 2,85 kb/min, levaria mais de 30 min até encontrar lesões no final do gene, fazendo com que o reparo de DNA vai TCR-NER se tornasse mais demorado em genes longos, principalmente se considerarmos que com 10 J/m² de luz UVC, genes com 100 kb encontrarão de 4 a 10 lesões, portanto essa viagem será refeita algumas vezes. Se isso for verdade, o desperdício de degradar mRNA parcialmente

sintetizado deve ser compensado por outra vantagem, talvez o controle temporal da expressão de genes longos.

Para nossa surpresa, genes com diferentes níveis da síntese de RNA apresentaram taxa similares de recuperação da transcrição (Fig. 4.4). Esse fato sugere que a eficiência de recuperação será similar - independente do nível de expressão gênica - e, assim, um gene com expressão mediana não terá melhor eficiência de recuperação da transcrição se aumentar ainda mais a síntese de RNA. Nós não temos conhecimento de nenhum outro estudo relacionando a recuperação da transcrição após danos no DNA e nível de expressão gênica e, de acordo com nossos dados, provavelmente o fator limitante não é o reconhecimento da lesão através do bloqueio da transcrição, mas sim a remoção do dímero ou o recomeço do alongamento da síntese de RNA .

Apesar de genes mais longos terem maior probabilidade de serem lesionados e inibidos por dímero de pirimidina, nós encontramos exemplos de genes pequenos entre a lista de genes com maior redução da síntese de RNA após luz UVC (Tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4), o que demonstra que a regulação da síntese de RNA em resposta a danos no DNA é mais complexa do que somente o tamanho do gene. Através de nossa análise em escala genômica conseguimos identificar grupos funcionais de genes e compreender melhor a resposta celular além da indução de reparo de DNA e parada do ciclo celular. Nas três diferentes linhagens, os mesmos grupos de genes foram induzidos e incluíram processamento de RNA, regulação de transcrição e tradução, os quais já foram observados também em queratinócitos irradiados com luz UVB (SESTO et al., 2002). A via de sinalização de ATR possui mais alvos relacionados à regulação da transcrição e tradução do que alvos em proteínas de reparo de DNA e ciclo celular (MATSUOKA et al., 2007; STOKES et al., 2007), o que demonstra, juntamente com nossos dados de genes com síntese induzida de RNA após luz UVC, a importância dessa regulação em resposta a danos no DNA. Com o bloqueio da transcrição, é necessário aumentar a estabilidade dos mRNA existentes, além de compensar a maquinaria de transcrição degradada ou bloqueada através da síntese de novos fatores basais e de alongação da transcrição. Porém, nossa surpresa foi observamos indução de genes relacionados à mitocôndria e autofagia, mesmo com irradiação com luz UVC, a qual não contém componente oxidativo, diferente de luz UVA e UVB. Esse efeito teve destaque na célula CS-B, como pode ser observado com a indução do gene modulador de autofagia

DRAM1 (Fig. 4.6A). Esse dado pode indicar que, após luz UVC, as células exigem maior quantidade de energia para conseguir ativar as respostas ao dano no DNA. Mitocôndria não tiveram síntese de RNA prejudicada provavelmente pelo grande número de cópias de mtDNA existentes, mas devido ao fato de não haver reparo por excisão nas mitocôndrias (PASCUCCI et al., 1997), as mitocôndrias dependerão de autofagia, fusão e fissão para conseguir eliminar os danos (BESS et al., 2012). Pelo fato de que células CS-B apresentam mitocôndrias com disfunções, além de equilíbrio redox alterado (D'ERRICO et al., 2013), pode indicar que essas células sofram ainda mais após luz UVC e, por isso, induzam mais genes de autofagia.

Por outro lado, o grupo de genes reprimidos envolve mitose, como seria esperado como uma resposta de parada do ciclo celular, além de genes de organização do citoesqueleto e adesão celular. Em queratinócitos também foi observada inibição de genes relacionados à adesão após luz UVB (SESTO et al., 2002). É conhecido que a irradiação com luz UV resultará na desorganização das fibras de colágeno e elastina, responsáveis pela resistência e força da pele, contribuindo para o fotoenvelhecimento (FISHER et al., 1997). Esse efeito seria tanto pela quebra de colágeno através da indução de matriz metaloproteinases (MMP) e pela inibição da síntese de colágeno. De fato, encontramos inibição em genes de colágeno – que em geral são genes longos, maiores que 100 kbp – com exemplos dentre os 25 genes mais reprimidos 24 hpi após 20 J/m² de luz UVC, como o gene *Col11A1* com 232 kbp (Tabela 4.4). Além disso, havia sido descrito indução da MMP1, MMP3 e MMP9 em pele 24 hpi (QUAN et al., 2009). Apesar de queratinócitos serem a principal fonte de MMP na pele, nós observamos ligeiro aumento na síntese de RNA das MMP expressas em fibroblastos: *MMP1* foi induzido 1,27 vezes e *MMP3* induzido 1,37 vezes, enquanto que *MMP9* não foi transcrito em nossas células. A indução desses genes não é uma surpresa quando constatamos o pequeno tamanho desses genes: 8,3 kbp; 7,8 kbp e 7,6 kbp, respectivamente.

Observamos que células deficientes em reparo NER mantém a indução de genes mesmo 24 hpi com 10 J/m². Enquanto células selvagens diminuem a indução de 994 genes a apenas 69 entre 6 hpi e 24 hpi (Fig. 4.7), as células XP-C apresentaram diminuição intermediária, de 821 genes 6 hpi a 582 genes 24 hpi (Fig. 4.8) e as células CS-B induziram ainda mais genes: de 957 genes 6hpi a 1437 genes 24 hpi após 10 J/m² de luz UVC (Fig. 4.9).

Esses dados demonstram quanto as células conseguiram lidar com os danos celulares, já que célula XP-C conseguiu recuperar a transcrição de genes curtos, a célula CS-B teve problemas com genes inibidos de todos comprimentos. Essa ideia é corroborada quando observamos uma célula proficiente em todas vias de reparo de DNA irradiada com uma dose maior (20 J/m^2): 966 genes induzidos 6 hpi e 927 genes 24 hpi (Fig. 4.10). É curiosa a semelhança na síntese de RNA de genes como *CDKN1A*, *MDM2*, *SESN1* comparando a célula XP-C com 10 J/m^2 e o fibroblasto selvagem com 20 J/m^2 (Fig. 4.5 e 4.6), indicando que, independente de seu conteúdo genético, a resposta ao dano no DNA será de acordo com as dificuldades encontradas.

Através da análise individual de genes, encontramos exemplos que apresentam diferentes níveis de recuperação da síntese de RNA após irradiação com luz UVC (Fig. 4.12). Quantificamos a remoção de dímeros de pirimidina, comparando a extremidade 5' (TSS) com uma porção mais 3' (END) dos genes, com o intuito de testar se diferenças no reparo de DNA poderiam explicar a diferença de recuperação da transcrição após luz UVC. Como esperávamos, a reparo acoplado à transcrição foi mais eficiente na extremidade 5' do que na extremidade 3' nos três genes testados (Fig. 4.13A). Entretanto, para nossa surpresa, o reparo de DNA na extremidade 3' de *SLIT2* não teve diferença significativa com o reparo de *PAPPA* tanto 6 hpi quanto 24 hpi. Da mesma forma, genes com síntese de RNA distinta também apresentaram eficiência de reparo muito semelhante. Apesar de que o gene testado mais transcrito *ANXA2* (com 27 RPKM) foi o único a reparar todas as lesões 6 hpi, a diferença de remoção para o gene testado menos transcrito *ATR* (com apenas 0,65 RPKM) na extremidade 5' (TSS) não foi significativamente diferente (Fig. 4.14), reforçando que o limitante é o tempo para remoção da lesão e não a detecção através do bloqueio da RNAPII. Em conjunto, os dados de recuperação de transcrição em escala global e reparo de DNA em diferentes genes mostram que a recuperação não depende apenas do reparo acoplado à transcrição. De acordo com essa ideia, estudos recentes mostram que o controle do recomeço da transcrição após danos no DNA envolve mudanças na cromatina. A chaperona de histona HIRA (*histone chaperone histone regulator A*) deposita histonas variantes H3.3 em regiões transcritas da cromatina danificada antes do término de reparo de DNA e foi identificada como peça importante na recuperação da transcrição após luz UVC (ADAM; POLO; ALMOUZNI, 2013). Outra chaperona conhecida como CAF-1 (*chromatin assembly*

fator 1) é conhecida por depositar a histona variante H3.1 na cromatina em resposta ao dano de DNA após a síntese de reparo de DNA e sua depleção não afeta a recuperação da transcrição, diferentemente do efeito da depleção de HIRA. Ainda, o recrutamento de HIRA à cromatina é dependente da detecção da lesão pelas proteínas DDB1, DDB2 e CUL4A e acumula mesmo em células XP-G em que o reparo de DNA não é completado, ocasião esta em que CAF-1 não acumula (GREEN; ALMOUZNI, 2003). Dessa forma, podemos prever que alguns genes como *SLIT2* podem ser regulados para não recuperar completamente a transcrição, mesmo com a remoção completa das lesões, através de alterações na cromatina (uma possível ausência de deposição de histonas variantes por HIRA) (Fig. 4.15).

Temos a consciência de que nosso estudo foi feito analisando a expressão gênica em uma população de células, com amostras contendo milhões de células diferentes, da qual tentamos inferir o estado em uma célula mediana. A expressão em uma célula individual deve diferir do que extrapolamos para uma célula mediana, já que aspectos, como fase do ciclo celular, não foram discriminados e fazem com que uma célula mediana não exista de verdade (LEVSKY; SINGER, 2003). Entretanto, com Bru-Seq nós conseguimos analisar individualmente a síntese de RNA dos aproximadamente 23 mil genes humanos e comparar a recuperação da transcrição após irradiação com luz UVC entre diferentes grupos de genes. Como a técnica somente quantifica RNA recém-sintetizado, é possível estimar a recuperação da transcrição após luz UVC sem depender da degradação de RNA pré-existentes.

Figura 29. Modelo de recuperação da transcrição após luz UVC. O comprimento do gene é determinante para saber se ele será inibido ou não. **A)** Genes curtos tem menor probabilidade de sofrerem lesões no DNA e, assim, a transcrição é menos inibida. **B)** Em genes mais longos, maior será a probabilidade de lesões e mais inibido será o gene. Além disso, observamos em genes longos que o reparo global por XPC contribui para a recuperação da transcrição, por remover lesões mais na extremidade 3' que ainda não bloquearam a RNAPII. A contribuição do tamanho do gene na resposta celular é exemplificada no efeito do fotoenvelhecimento da pele, em que é observada diminuição de colágeno. Genes de colágeno são inibidos por luz UV – portanto, menos síntese – e genes de metaloproteinases que degradam colágeno são induzidos por luz UV – assim, maior degradação da proteína. Enquanto genes de colágeno têm 100 kbp ou mais de comprimento, genes de metaloproteinases têm 10 kbp ou menos. Dessa forma, a evolução também pode selecionar tamanho de genes (através do tamanho dos introns) como um modo de regular as respostas celulares que necessitam de transcrição. **C)** Genes mais expressos não recuperam a transcrição mais rapidamente, provavelmente porque o fator limitante é a remoção da lesão e não o reconhecimento dela. Pelos dados em célula XP-C, observamos que a velocidade da recuperação da transcrição diminuiu com o tempo em genes longos e, dessa forma, a degradação da RNAPII (como forma de fornecer acesso à maquinaria de reparo de DNA) parece ser uma estratégia muito utilizada, já que com a degradação, a transcrição recomençaria do zero e demoraria cada vez mais para ser bloqueada por uma lesão na extremidade 3' do gene. Porém, a remoção da lesão não é o único fator que promove recuperação da transcrição. Trabalhos na literatura científica sugerem que a deposição de histonas variantes pela chaperona HIRA é fundamental para um gene recomençar a transcrição, mesmo que todas as lesões já tenham sido removidas.

Dessa forma, nossas listas de genes induzidos e inibidos são únicas e devem contribuir para compreender diretamente como as células lidam com dímeros de pirimidina em regiões transcritas. Apesar de que nossa taxa de transcrição é uma distribuição relativa e não de valores absolutos, ainda assim conseguimos estimar a recuperação da síntese de RNA comparando a concentração de sinal obtido ao longo do gene, já que após irradiação com luz UVC o sinal se concentra na extremidade 5' dos genes. Com isso, observamos a importância do comprimento do gene, mas não do nível de expressão para a recuperação da transcrição, além de que reparo de DNA não é suficiente para que um gene recomece a síntese de RNA após danos causados por luz UVC. Esses resultados revelam a complexidade da resposta ao dano no DNA e nos dão pistas de que características do genoma foram selecionadas durante a evolução de modo a promover uma regulação mais eficiente frente a agentes que desafiem a homeostase celular.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Linhagens celulares

As seguintes linhagens celulares de fibroblastos humanos primários, obtidas do repositório Coriell (EUA), foram utilizadas no projeto:

Ctrl (fibroblasto selvagem, obtido de prepúcio e imortalizado por hTERT, gentilmente cedido pelo Dr. Mary Davis do Departamento de Oncologia e Radiação da Universidade de Michigan, EUA).

XP67TMA ou GM14867 (fibroblasto primário de pele de paciente do sexo masculino com 7 anos de idade homozigoto para mutação em *XPC*: : mutação sem-sentido no exon 8, nucleotídeo 1840 (C para T) resultando em um códon de parada e proteína truncada).

CS1AN ou GM00739 (fibroblasto primário de pele de paciente do sexo feminino com 3 anos de idade heterozigoto composto para mutações em *CSB*: Códon de parada no exon 5 (nucleotídeo 1088; A para T) e segundo alelo com transição C>T no nucleotídeo 2648 no exon 15, resultando em erro de *splicing* e mudança do quadro de leitura).

As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, EUA), suplementados com 15% de SFB, 1% de antibióticos e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO₂.

4.4.2 Bru-Seq: Avaliação da recuperação da transcrição após danos no DNA em escala genômica (Fig. 4.16)

Irradiação e marcação com BrU

Fibroblastos primários foram cultivados em placas de 100 mm de diâmetro com 10 mL de meio DMEM com 10% de SFB. Para cada ponto de coleta foram utilizadas 3 placas de 100 mm de diâmetro com 80% de confluência aproximadamente. Essas células foram irradiadas com luz UVC e incubadas com 2 mM de bromouridina (BrU) em meio condicionado (240 µL de 50 mM BrU – Sigma, EUA – dissolvido em PBS adicionado em 6 mL do meio de cultura) para marcação do RNA nascente 30 min antes da coleta. Para coletar, as células foram tripsinizadas e ressuspendidas em 1,5 mL de TriZol (Invitrogen) por placa.

Figura 30. Diagrama ilustrativo com o resumo da técnica de Bru-Seq.

Coleta de RNA

A coleta do RNA foi feita com a adição de 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol, agitação por 10 segundos e centrifugação a 12000 g por 15 min a 4º C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido a um tubo novo e o RNA foi precipitado com 0,5 mL de

Isopropanol por mL de Trizol. Após agitação, a mostra foi centrifugada a 12000 g por 10 min a 4° C e o precipitado celular foi lavado com etanol 75% (diluído em água DEPC) seguido de nova centrifugação a 7500 g por 5 min a 4 °C. O precipitado de RNA foi ressuspensionado em 200 µL de água milli-Q DEPC.

Imunoprecipitação do RNA marcado com BrU

50 µL de *beads* magnética Dynabeads *goat* anti-mouse IgG beads (Invitrogen, EUA - cat# 110.33) foram conjugadas com 2 µg de anticorpo Mouse anti-BrdU (BD Pharmingen – cat# 555627) por 1 h em temperatura ambiente com a adição de 1 µL de inibidor de RNase (RNase Out – Invitrogen, cat# 10777-019). Usando um ímã para capturar as *beads* magnéticas, foram realizadas 3 lavagens com 0,1% BSA em DEPC-PBS para retirar o excesso de anticorpo e ressuspensionadas em 200 µL de 0,1% BSA em DEPC-PBS. Então, 180 µL do RNA coletado foram aquecidos a 80 °C por 10 min e incubados com os 200 µL das *beads* conjugadas e 1 µL de inibidor de RNase por 1h em temperatura ambiente com leve rotação. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com 0,1% BSA em DEPC-PBS, para retirar o RNA que não se ligou às *beads*. Para recuperar o RNA marcado com BrU, as *beads* foram ressuspensionadas em 35 µL de água milli-Q DEPC e fervidas por 10 min, sendo o sobrenadante capturado e quantificado com espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Biblioteca para sequenciamento de nova geração

Para construção da biblioteca para sequenciamento fita-específico foi utilizado o kit *TruSeq RNA Sample Prep Kits v2* (Illumina, San Diego, CA, EUA). Para isso foram utilizados 300 ng de RNA por amostra de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante:

- a) Fragmentação do RNA;
- b) Síntese da primeira fita do cDNA; Síntese da segunda fita do cDNA contendo dU ao invés de dT;
- c) Reparo das extremidades (End Repair);
- d) Adenilação da extremidade 3’;
- e) Ligaço de adaptadores;
- f) Seleço de tamanho de 300 pb com purificaço de gel de agarose;
- g) Digesto da uridina e amplificaço por PCR (15 ciclos)

Em todas as etapas de purificao do cDNA foram utilizadas *beads* AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA - cat# A63881). Na ltima etapa de purificao, aps o PCR, o DNA foi ressuspensionado em 20 µL de Tris 5 mM, sendo 4 µL utilizados em gel de agarose 1,5% para confirmar a amplificao .

O DNA foi extraído através do **kit DNaeasy Blood and Tissue** (Qiagen, EUA – cat# 69504) e quantificado através de fluorescência (placas pretas de multiwell-96 medidas em Fluorômetro OPTIMA da BMG LABTECH POLARstar no filtro de emissão de 520 nm) após incubação com Quant-iT **Picogreen** dsDNA kit (Invitrogen, EUA – cat# P7589). Cada amostra foi diluída para 3 ng/μL. Para realização do XL-PCR foi utilizado o **Takara kit** (TaKaRa LA PCR, cat # RR013A, Takara Bio Inc, Milipore):

Reação por amostra (40 uL):

dNTP – 6,6 uL

Tampão com Mg – 4,4 uL

Primer – 0,4 uL (Forward + Reverse 10 μM cada)+ 9,6 uL H₂O milli-Q

DNA – 5uL

Os tubos foram colocados no termociclador a 85 °C por 5 min para fazer *hot start* e diminuir formação de *primer dimers*. Depois de 3 min foi adicionada a Taq polimerase (em água milli-Q), durante os 2 min finais da primeira etapa do PCR:

Taq – 0,36 uL + 14,64 uL de H₂O

Programa XL-PCR:

- 1) 85^o – 5 min (*Hot start* – adiciona a Taq polimerase faltando 2 min)
- 2) 94^o - 3 min (desnaturação pré-corrida)
- 3) 30x - 94^o - 30 segundos (desnaturação)
- 69^o - 9 min (extensão)
- 4) 4^o - infinito

Após a corrida do PCR, uma parte do produto (10 μL dos 40 μL) é corrida em gel de agarose 0,7% (0,7 g agarose + 100 mL TAE 1x + 4,5 uL brometo de etídio) por 30 min a 80V, para conferir presença de somente uma banda na altura desejada, sem arrasto.

Por fim, o produto de PCR é quantificado com Quant-iT Picogreen dsDNA kit (10 μL de DNA + 90 μL TE 1x + 100 μL *picogreen* diluído 1:200 em TE 1x) com leitura da fluorescência no GloMax Multi *system detection* (Promega, EUA).

A análise é calculada com a razão dos valores corrigidos das fluorescências (subtrai amostra em branco), sendo amostras irradiadas divididas por amostra não irradiada. Em

seguida calcula-se o logaritmo natural negativo ($-\ln$) dessa razão para determinar a frequência de lesões por fragmento. O valor obtido na amostra irradiada 0h após luz UVC é considerado 100% de lesões.

Desenho dos *primers*:

- Conteúdo de GC de 40–60% - Tamanho do *primer* de 20–25 nucleotídeos
- Tamanho desejado do produto de PCR: 12–15 kpb (Tabela 4.6) - T_m de 68–70 °C

Tabela 4.6. Lista de *primers* de XL-PCR utilizados neste projeto

Gene	Tamanho do gene	Local amplificado	Nº de ciclos no PCR	Sequência
ATR (5' TSS)	129,5 kbp	2,9 – 15,2 kbp	29	F - ATCTGGCTCAGCCTGCCTCTGACT R - CGACCAGCAGTTCCCCATCTCTCT
ATR (3' END)	129,5 kbp	100,7 – 113,1 kbp	29	F - ATCCACGGCACAGGAACACGTGA R - GCAAAACCCCAACCCTCTTCCCTA
PAPPA (5' TSS)	248,5 kbp	3,4 – 15,9 kbp	31	F - CTGCCCCGGTTCAAACCTTCACTG R - TGCAGGAGGAGCATGGACACATC
PAPPA (3' END)	248,5 kbp	189,6 – 202,2 kbp	30	F - GCTTGCCGAGGGACACAAGAGAA R - ATCCTTTCCCGCCAGGATCTGAA
SLIT2 (5' TSS)	365,5 kbp	3,3 – 15,9 kbp	31	F - GGTTGGAAGCATGCCATAGAACCA R - TGCAAAAGCATTCCAGGGAGGAA
SLIT2 (3' END)	365,5 kbp	193 – 205,9 kbp	30	F - TGCATCGCTGTGGCTCATGG R - TCTTTTGGGGGCTGGGGAGA
Região intergênica	-	Chr 3 - 143968077 até 144067668	30	F - TTTCCGGCCATGAGAATCTGTCCT R - GGCTCCCGTGATGTTTCTGGTAGC
DRAM1	46,3 kbp	4,1 – 16 kbp	29	F - CCCATGCCAGGCTGAAGGTATCTC R - GCATTTGCCAACTTCCATGGTGAA
ANXA2	50,8 kbp	4,1 – 16,3 kbp	29	F - TGGAAACCCTGTGGGCGGATAATA R - CTCCAGGCCTAAGGAGCAGCAGAA
LECT1	36,6 kbp	4,7 – 17,9 kbp	29	F - AACCCCCAGGAGTGTTTCTTGTGA R - GTCAGCCATTGTTGGGGAATTGGT

CAPÍTULO 5:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

Esse trabalho corrobora a ideia de que a resposta ao dano no DNA é ampla e atua tanto no controle do ciclo celular, mas também na regulação de vias de tolerância de modo a evitar bloqueios durante a replicação e na promoção de reparo de DNA favorecendo também recuperação do bloqueio da transcrição. A quinase ATR é essencial em todos esses processos e mesmo em uma célula selvagem - sem mutações em proteínas do reparo por excisão de nucleotídeos e polimerases translesão – a depleção desta quinase impossibilita o término da replicação após irradiação com luz UVB, devido à indução de estresse na forquilha de replicação e morte em fase S.

Essa importância de ATR pode ser explorada para potencializar quimioterápicos em tratamento antitumoral. Mutações em p53 – muito comuns em tumores – resultam em uma letalidade sintética ainda maior quando a quinase ATR é depletada em linhagens tumorais. A morte preferencial de células mutadas em p53 faz com que essa abordagem seja vantajosa para diminuir os efeitos colaterais dos quimioterápicos, já que dessa forma células saudáveis do indivíduo não seriam muito afetadas. Além disso, o silenciamento de ATR potencializou a morte induzida por diferentes tipos de quimioterápicos, os quais resultam em indução de lesões bem distintas, o que coloca ATR com um alvo muito promissor. É possível ainda que o uso de inibidores de ATR em protetores solar possa ser usado como prevenção ao câncer de pele, pois poderia induzir a morte da célula que viria sofrer transformação maligna.

Por fim, através de sequenciamento de nova geração, conseguimos acompanhar individualmente e globalmente a síntese de RNA dos diferentes genes do genoma humano e avaliamos quais características dos genes contribuem com recuperação da transcrição após luz UV. Esse estudo é de nosso conhecimento, o primeiro que demonstra que a ação de reparo acoplado à transcrição é geral e afeta a maioria dos genes. Nós constatamos ainda que o comprimento do gene é determinante na inibição da transcrição do gene frente a dímeros de pirimidina e em

sua recuperação ao longo do tempo. Genes importantes para a resposta ao dano no DNA, como aqueles relacionados ao reparo de DNA e de controle do ciclo celular (por exemplo: XPC e p21) são genes muito curtos e são facilmente induzidos após luz UV. Entretanto, genes compridos demoram mais para recuperar completamente a transcrição após danos no DNA. Como exemplo, é conhecido que o fenótipo de fotoenvelhecimento relaciona-se à diminuição de colágeno após irradiações com luz UV. Esse efeito é devido tanto à diminuição da síntese de colágeno quanto pela indução de metaloproteinases que degradam colágeno. Nós verificamos que genes de colágeno são maiores que 100 kbp e estão entre os genes mais inibidos por luz UV, enquanto genes de metaloproteinases são menores que 10 kbp e, por terem menos indução de danos, são facilmente induzidos após luz UV. Esse é um exemplo da importância do comprimento do gene em resposta a danos no DNA e, provavelmente, a evolução também atua na seleção do comprimento dos introns como forma de regulação da expressão gênica. Outra característica de genes - o nível de expressão gênica - de maneira surpreendente, não contribui de maneira significativa (diferente do comprimento do gene) na recuperação da transcrição após irradiação, como também não modifica a eficiência de reparo de DNA.

Nós também observamos que o reparo por excisão de nucleotídeos global auxilia na recuperação da transcrição após luz UV em genes longos. Além disso, a eficiência da recuperação da transcrição diminui ao longo do tempo, o que sugere as RNA polimerases não devem continuar de onde foram bloqueadas, mas devem retornar ao início do gene e o percurso até encontrar uma nova lesão em genes longos faz com que a recuperação seja um pouco mais devagar ao longo do tempo. Por fim, constatamos que não basta apenas o reparo de DNA para explicar as diferenças na eficiência de recuperação da síntese de RNA entre diferentes genes. Dessa forma, outra característica de genes, como talvez o remodelamento da cromatina diferencial, deve atuar para garantir com que a transcrição de um determinado gene retorne, ou não, ao padrão antes da irradiação com luz UV. O núcleo celular não é algo homogêneo e nosso estudo em escala genômica permitiu uma análise em maior detalhamento e uma compreensão de quais características são importantes na resposta ao bloqueio da transcrição.

5.2 REFERÊNCIAS

- ADAM, S.; POLO, S. E.; ALMOUZNI, G. Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 94–106, 2013.
- AGUILERA, A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. **Nature Reviews. Genetics**, v. 9, n. 3, p. 204–217, 2008.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell, 5th Edition**. [s.l.]. Garland Science, 2008, p. 1725
- ALDERTON, G. K. et al. Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 24, p. 3127–3138, 2004.
- AL-KHALAF, H. H.; HENDRAYANI, S.-F.; ABOUSSEKHRA, A. ATR controls the p21(WAF1/Cip1) protein up-regulation and apoptosis in response to low UV fluences. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 12, p. 930–938, 2012.
- ANDEGEKO, Y. et al. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 38224–38230, 2001.
- ARAKI, M. et al. Reconstitution of damage DNA excision reaction from SV40 minichromosomes with purified nucleotide excision repair proteins. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 459, p. 147–160, 2000.
- ARLETT, C. F.; HARCOURT, S. A.; BROUGHTON, B. C. The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. **Mutation Research**, v. 33, p. 341–346, 1975.
- ASIN-CAYUELA, J.; GUSTAFSSON, C. M. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 111–117, 2007.
- ATIENZA, J. M. et al. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. **Journal of Biomolecular Screening: The Official Journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 10, p. 795–805, 2005.
- AUCLAIR, Y. et al. ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 46, p. 17896–17901, 2008.
- AUCLAIR, Y. et al. Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. **DNA Repair**, v. 9, p. 754–764, 2010.
- BARTKOVA, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, p. 864–870, 2005.
- BERQUIST, B. R. et al. Human Cockayne syndrome B protein reciprocally communicates with mitochondrial proteins and promotes transcriptional elongation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 8392–8405, 2012.
- BESS, A. S. et al. Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 16, p. 7916–7931, 2012.
- BEUKERS, R.; BERENDS, W. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 41, p. 550–551, 1960.
- BHANA, S. et al. P53-dependent global nucleotide excision repair of cisplatin-induced intrastrand cross links in human cells. **Mutagenesis**, v. 23, n. 2, p. 131–136, 2008.
- BIANCHI, J. et al. PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication. **Molecular Cell**, v. 52, n. 4, p. 566–573, 2013.
- BOHR, V. A et al. 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. 359–369, 1985.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- BOMGARDEN, R. D. et al. Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. **The EMBO journal**, v. 25, n. 11, p. 2605–2514, 2006.
- BOYCE, R. P.; HOWARD-FLANDERS, P. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. Coli* K-12. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, p. 293–300, 1964.
- BRANZEI, D.; FOIANI, M. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. **DNA Repair**, v. 6, n. 7, p. 994–1003, 2007.
- BROOMFIELD, S.; HRYCIW, T.; XIAO, W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 486, p. 167–184, 2001.
- BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. **Genes & Development**, v. 14, n. 4, p. 397–402, 2000.
- BYUN, T. S. et al. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. **Genes & Development**, v. 19, p. 1040–1052, 2005.
- CALLEGARI, A. J. et al. Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8219–8224, 2010.
- CASPER, A. M. et al. ATR regulates fragile site stability. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 779–789, 2002.
- CHANG, D. J.; CIMPRICH, K. A. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 82–90, 2009.
- CHAUDHARY, P. et al. 4-Hydroxynonenal induces G2/M phase cell cycle arrest by activation of the ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR)/checkpoint kinase 1 (Chk1) signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 28, p. 20532–20446, 2013.
- CHEN, Y.-W. et al. Human DNA polymerase eta activity and translocation is regulated by phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 43, p. 16578–16583, 2008.
- CIMPRICH, K. A.; CORTEZ, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 8, p. 616–627, 2008.
- CLEAVER, J. E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. **Nature**, v. 218, n. 5142, p. 652–656, 1968.
- CLEAVER, J. E. et al. A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. **Human Mutation**, v. 14, p. 9–22, 1999a.
- CLEAVER, J. E. et al. Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to P53 function in the xeroderma pigmentosum variant. **Cancer Research**, v. 59, n. 5, p. 1102–1108, 1999b.
- CLEAVER, J. E. et al. Polymerase eta and p53 jointly regulate cell survival, apoptosis and Mre11 recombination during S phase checkpoint arrest after UV irradiation. **DNA Repair**, v. 1, n. 1, p. 41–57, 2002.
- CLEAVER, J. E. γH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!”. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1230–1239, 2011.
- CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 11, p. 756–768, 2009.
- CLEAVER, J. E.; THOMAS, G. H.; PARK, S. D. Xeroderma pigmentosum variants have a slow recovery of DNA synthesis after irradiation with ultraviolet light. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 564, p. 122–131, 1979.
- CONNEY, A. H. et al. Stimulatory effect of oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 28, p. 199–206, 2007.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- CORTEZ, D. Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37139–37145, 2003.
- COSTA, R. M. A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, p. 1083–1099, 2003.
- COUCH, F. B. et al. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. **Genes & Development**, v. 27, n. 14, p. 1610–1623, 2013.
- CREMER, T.; CREMER, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, n. 4, p. 292–301, 2001.
- CRICK, F. The double helix: a personal view. **Nature**, v. 248, n. 5451, p. 766–769, 1974.
- CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801–817, 2012.
- D'ERRICO, M. et al. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5-6, p. 261–269, 2013.
- DAIGAKU, Y.; DAVIES, A. A; ULRICH, H. D. Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 951–955, 2010.
- DE BOER, J. et al. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. **Science**, v. 296, p. 1276–1279, 2002.
- DE FERAUDY, S. et al. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 15, p. 6870–6875, 2010.
- DENT, P. et al. CHK1 inhibitors in combination chemotherapy: thinking beyond the cell cycle. **Molecular Interventions**, v. 11, n. 2, p. 133–140, 2011.
- DESPRAS, E. et al. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 9, p. 1690–1701, 2010.
- DESPRAS, E. et al. Regulation of the specialized DNA polymerase eta: revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 9, p. 752–765, 2012.
- DIAMANT, N. et al. DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. 170–180, 2012.
- DIGIOVANNA, J. J.; KRAEMER, K. H. Shining a light on xeroderma pigmentosum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 785–796, 2012.
- DONAHUE, B. A et al. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8502–8506, 1994.
- DYNOODT, P. et al. Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentary process. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 201–209, 2012.
- FANG, Y. et al. ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background. **The EMBO journal**, v. 23, p. 3164–3174, 2004.
- FISHEL, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v. 75, p. 1027–1038, 1993.
- FISHER, G. J. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1419–1428, 1997.
- FOKAS, E. et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 12, p. e441, 2012.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- FORMENT, J. V. et al. Structure-specific DNA endonuclease mus81/eme1 generates DNA damage caused by chk1 inactivation. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.
- FRIEDBERG, E. **DNA repair and Mutagenesis, 2nd Edition**. 2nd. ed. [s.l.] ASM Press, 2006. p. 1,118
- FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436–440, 2003.
- FROGET, B. et al. Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 445–456, 2008.
- FU, D. et al. Recruitment of DNA polymerase eta by FANCD2 in the early response to DNA damage. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 12, n. 5, p. 803–809, 2013.
- FURDA, A. M. et al. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR. **Methods in Molecular Biology**, v. 920, p. 111–132, 2012.
- GENG, Y. et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 5, p. 473–481, 2010.
- GHOSAL, G.; CHEN, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. **Translational Cancer Research**, v. 2, n. 3, p. 107–129, 2013.
- GIANNATTASIO, M. et al. Exo1 competes with repair synthesis, converts NER intermediates to long ssDNA gaps, and promotes checkpoint activation. **Molecular Cell**, v. 40, n. 1, p. 50–62, 2010.
- GÖHLER, T. et al. ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is needed for efficient recovery from UV damage. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 2, p. 219–227, 2011.
- GORGOLIS, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, p. 907–913, 2005.
- GOTTLIEB, T. M.; JACKSON, S. P. The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. **Cell**, v. 72, p. 131–142, 1993.
- GREEN, C. M.; ALMOUZNI, G. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 5163–5174, 2003.
- GRUMMT, I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. **Genes & Development**, v. 17, n. 14, p. 1691–1702, 2003.
- GUO, Z. et al. ATM activation by oxidative stress. **Science**, v. 330, p. 517–521, 2010.
- GUTSCHNER, T. et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, p. 1180–1189, 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HANASOGE, S.; LJUNGMAN, M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 11, p. 2298–2304, 2007.
- HANAWALT, P. C.; SPIVAK, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 958–970, 2008.
- HARRISON, J. C.; HABER, J. E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 209–235, 2006.
- HEFFERNAN, T. P. et al. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 24, p. 8552–8561, 2002.
- HELLEDAY, T. et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 3, p. 193–204, 2008.
- HELMRICH, A.; BALLARINO, M.; TORA, L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. **Molecular Cell**, v. 44, n. 6, p. 966–977, 2011.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- HENDEL, A. et al. Reduced efficiency and increased mutagenicity of translesion DNA synthesis across a TT cyclobutane pyrimidine dimer, but not a TT 6-4 photoproduct, in human cells lacking DNA polymerase η . **DNA Repair**, v. 7, n. 10, p. 1636–1646, 2008.
- HENDEL, A. et al. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 9, p. e1002262, 2011.
- HOEGE, C. et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. **Nature**, v. 419, n. 6903, p. 135–141, 2002.
- HOLLAENDER, A.; CLAUS, W. D. The bactericidal effect of ultraviolet radiation on Escherichia Coli in liquid suspensions. **The Journal of General Physiology**, v. 19, p. 753–765, 1936.
- HOLLIDAY, R. A mechanism for gene conversion in fungi. **Genetical Research**, v. 5, p. 282–304, 1964.
- HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, p. 49–53, 1991.
- HUSCHTSCHA, L. I.; HOLLIDAY, R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v. 63, p. 77–99, 1983.
- IKEHATA, H.; ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 2, p. 115–125, 2011.
- ISHII, N. et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 9, p. 469–479, 1999.
- JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2467–2498, 1999.
- JARUGA, P.; DIZDAROGLU, M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 8, p. 1389–1394, 1996.
- JOHNSON, R. E. et al. Fidelity of human DNA polymerase η . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7447–7450, 2000.
- KAMILERI, I.; KARAKASILIOTI, I.; GARINIS, G. A. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. **Trends in Genetics : TIG**, v. 28, n. 11, p. 566–573, 2012.
- KANAZIR, D.; ERRERA, M. Metabolism of nucleic acids by E. coli B after ultraviolet irradiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 14, n. 1, p. 62–66, 1954.
- KANNOUCHE, P. L.; WING, J.; LEHMANN, A. R. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. **Molecular Cell**, v. 14, n. 4, p. 491–500, 2004.
- KASTAN, M. B. et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304–6311, 1991.
- KASTAN, M. B. et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell**, v. 71, p. 587–597, 1992.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n.7015, p. 316–323, 2004.
- KELNER, A. Effect of Visible Light on the Recovery of Streptomyces Griseus Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 35, n. 2, p. 73–79, 1949.
- KIM, E. L. et al. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 4, p. 389–400, 2010.
- KOBAYASHI, N. et al. Quantitation and visualization of ultraviolet-induced DNA damage using specific antibodies: application to pigment cell biology. **Pigment Cell Research**, v. 14, n. 2, p. 94–102, 2001.
- KOEHLER, D. R.; HANAWALT, P. C. Recruitment of damaged DNA to the nuclear matrix in hamster cells following ultraviolet irradiation. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 15, p. 2877–2884, 1996.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- KOGANTI, S. et al. STAT3 interrupts ATR-Chk1 signaling to allow oncovirus-mediated cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 4966-4951, 2014.
- KORZENIEWSKI, N. et al. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. **Cancer Letters**, v. 305, n. 2, p. 113-122, 2011.
- LANCTÔT, C. et al. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 2, p. 104-115, 2007.
- LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v. 278, p. 261-263, 1979.
- LAPOSA, R. R. et al. p53 suppression overwhelms DNA polymerase eta deficiency in determining the cellular UV DNA damage response. **DNA Repair**, v. 6, n. 12, p. 1794-1804, 2007.
- LEE, J.-M.; YOON, T.-J.; CHO, Y.-S. Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 782041, 2013.
- LEGROS, F. et al. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2653-2662, 2004.
- LEVSKY, J. M.; SINGER, R. H. Gene expression and the myth of the average cell. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-6, 2003.
- LEWIS, K. A et al. Ataxia telangiectasia and rad3-related kinase contributes to cell cycle arrest and survival after cisplatin but not oxaliplatin. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 855-863, 2009.
- LI, Z. et al. XPA-mediated regulation of global nucleotide excision repair by ATR Is p53-dependent and occurs primarily in S-phase. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e28326, 2011.
- LIMA-BESSA, K. M. et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. **DNA Repair**, v. 7, n. 2, p. 303-312, 2008.
- LIMOLI, C. L. et al. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 233-238, 2002.
- LINDAHL, T. An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 3649-3653, 1974.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-715, 1993.
- LINDSEY-BOLTZ, L. A et al. Coupling of human DNA excision repair and the DNA damage checkpoint in a defined in vitro system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 8, p. 5074-5082, 2014.
- LINZER, D. I.; LEVINE, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell**, v. 17, p. 43-52, 1979.
- LIU, G.; CHEN, X. DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 4, p. 1398-413, 2006.
- LJUNGMAN, M. Recovery of RNA synthesis from the DHFR gene following UV-irradiation precedes the removal of photolesions from the transcribed strand. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 3, p. 395-399, 1999.
- LJUNGMAN, M. The DNA damage response--repair or despair? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 8-9, p. 879-889, 2010.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- LJUNGMAN, M.; ZHANG, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for UV light-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 13, p. 823–831, 1996.
- MAHEN, R. et al. A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e61893, 2013.
- MAILAND, N. Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. **Science**, v. 288, n. 5470, p. 1425–1429, 2000.
- MARTI, T. M. et al. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9891–9896, 2006.
- MASTERS, M.; PARDEE, A. B. Failure of ultraviolet-irradiated Escherichia coli to produce a cross-reacting protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 56, p. 609–611, 1962.
- MASUTANI, C. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. **Nature**, v. 399, p. 700–704, 1999.
- MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160–1166, 2007.
- MATSUOKA, S.; HUANG, M.; ELLEDGE, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. **Science**, v. 282, p. 1893–1897, 1998.
- MAYNE, L. V; LEHMANN, A. R. Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. **Cancer Research**, v. 42, p. 1473–1478, 1982.
- MCCULLOCH, S. D.; KUNKEL, T. A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 148–161, 2008.
- MCKAY, B. C. et al. UV light-induced degradation of RNA polymerase II is dependent on the Cockayne's syndrome A and B proteins but not p53 or MLH1. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 485, n. 2, p. 93–105, 2001.
- MCKAY, B. C. et al. Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6582–6586, 2004.
- MEHTA, I. S. et al. Chromosome territories reposition during DNA damage-repair response. **Genome Biology**, v. 14, n. 12, p. R135, 2013.
- MELLON, I.; HANAWALT, P. C. Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. **Nature**, v. 342, p. 95–98, 1989.
- MELLON, I.; SPIVAK, G.; HANAWALT, P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. **Cell**, v. 51, p. 241–249, 1987.
- MENCK, C. F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 1 Suppl, p. 220–233, 2014.
- MERCER, T. R. et al. The human mitochondrial transcriptome. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 645–658, 19 2011.
- MISTELI, T.; SOUTOGLU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 2009.
- MITCHELL, D. L.; NGUYEN, T. D.; CLEAVER, J. E. Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 5353–5356, 1990.
- MOURÓN, S. et al. Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 12, p. 1383–1389, 2013.
- MULLER, H. J. Artificial transmutation of the gene. **Science**, v. 66, p. 84–87, 1927.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- MURGA, M. et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. **Nature Genetics**, v. 41, n. 8, p. 891–898, 2009.
- MYERS, K. et al. ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 1, p. e1000324, 2009.
- NAKAJIMA, S. et al. UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46674–46677, 2004.
- NAKAZAWA, Y. et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. **Nature Genetics**, v. 44, n. 5, p. 586–592, 2012.
- NGHIEM, P. et al. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9092–9097, 2001.
- NIIMI, A. et al. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16125–16130, 2008.
- NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 66, p. 994–1009, 2009.
- PASCUCCI, B. et al. DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, n. 2, p. 417–427, 1997.
- PAULSEN, M. T. et al. Use of Bru-Seq and BruChase-Seq for genome-wide assessment of the synthesis and stability of RNA. **Methods**, v. 67, p. 45–55, 2013a.
- PAULSEN, M. T. et al. Coordinated regulation of synthesis and stability of RNA during the acute TNF-induced proinflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 6, p. 2240–2245, 2013b.
- PEASLAND, A. et al. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 3, p. 372–381, 2011.
- PETERMANN, E.; CALDECOTT, K. W. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 19, p. 2203–2209, 2006.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. e45, 2001.
- PREUSSER, M. et al. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 1, p. 9–21, 2011.
- QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 20–24, 2009.
- RAGLAND, R. L. et al. RNF4 and PLK1 are required for replication fork collapse in ATR-deficient cells. **Genes & Development**, v. 27, n. 20, p. 2259–2273, 2013.
- RASTOGI, R. P. et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 592980, 2010.
- RATNER, J. N. et al. Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 5184–5189, 1998.
- REAPER, P. M. et al. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 7, p. 428–30, 2011.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- REVET, I. et al. Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 21, p. 8663–8667, 2011.
- ROCKX, D. A et al. UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10503–10508, 2000.
- ROGAKOU, E. P. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5858–5868, 1998.
- ROHALY, G. et al. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 21–32, 2005.
- ROHALY, G. et al. Simian virus 40 activates ATR-Delta p53 signaling to override cell cycle and DNA replication control. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10727–10747, 2010.
- ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385–386, 1969.
- ROWLAND, F. S. Stratospheric ozone depletion. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 361, p. 769–790, 2006.
- RUPERT, C. S.; GOODGAL, S. H.; HERRIOTT, R. M. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. **The Journal of General Physiology**, v. 41, p. 451–471, 1958.
- RUPP, W. D.; HOWARD-FLANDERS, P. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. **Journal of Molecular Biology**, v. 31, p. 291–304, 1968.
- RUSSELL, K. J. et al. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 1639–1642, 1995.
- RUZANKINA, Y. et al. Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 113–126, 2007.
- SACHDEVA, M.; MO, Y.-Y. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. **American Journal of Translational Research**, v. 2, n. 2, p. 170–180, 2010.
- SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 39–85, 2004.
- SARKARIA, J. N. et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. **Cancer Research**, v. 59, n. 17, p. 4375–4382, 1999.
- SATOKATA, I. et al. Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 273, p. 193–202, 1992.
- SCHLEGEL, R.; PARDEE, A. B. Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. **Science**, v. 232, n. 4755, p. 1264–1266, 1986.
- SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. **ChemMedChem**, v. 2, n. 7, p. 944–986, 2007.
- SCHUCH, A. P. et al. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 8, n. 1, p. 111–120, 2009.
- SCHUMACHER, B.; GARINIS, G. A; HOEIJMAKERS, J. H. J. Age to survive: DNA damage and aging. **Trends in Genetics: TIG**, v. 24, n. 2, p. 77–85, 2008.
- SCHWERTMAN, P. et al. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. **Nature Genetics**, v. 44, n. 5, p. 598–602, 2012.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- SERTIC, S. et al. Human exonuclease 1 connects nucleotide excision repair (NER) processing with checkpoint activation in response to UV irradiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 33, p. 13647–13652, 2011.
- SESTO, A. et al. Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2965–2970, 2002.
- SETLOW, R. B.; CARRIER, W. L. THE DISAPPEARANCE OF THYMINE DIMERS FROM DNA: AN ERROR-CORRECTING MECHANISM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, p. 226–231, 1964.
- SHEN, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 2011.
- SHIM, M. S.; KWON, Y. J. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 23, p. 4814–4827, 2010.
- SHRIVASTAV, M.; DE HARO, L. P.; NICKOLOFF, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 134–147, 2008.
- SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 2003.
- SINGH, M. et al. Lamin A/C depletion enhances DNA damage-induced stalled replication fork arrest. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 6, p. 1210–1222, 2013.
- SIRBU, B. M. et al. Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. **Genes & Development**, v. 25, n. 12, p. 1320–1327, 2011.
- SØRENSEN, C. S. et al. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 195–201, 2005.
- SØRENSEN, C. S.; SYLJUÅSEN, R. G. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 477–486, 2012.
- SOUFIR, N. et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 1537–1542, 2010.
- SPARDY, N. et al. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. **Cancer Research**, v. 69, n. 17, p. 7022–7029, 2009.
- SPERONI, J. et al. Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7344–7349, 2012.
- 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**, v. 5, p. 13–22, 2006.
- STELTER, P.; ULRICH, H. D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. **Nature**, v. 425, p. 188–191, 2003.
- STIFF, T. et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2390–6, 2004.
- STOKES, M. P. et al. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19855–19860, 2007.
- STRACHAN, T.; READ, A. P. Chapter 9: Organization of the human genome. In: **Human Molecular Genetics 3rd Edition**. [s.l.]. New York, Wiley-Liss, 2004.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- SUBRAMANIAN, L.; NAKAMURA, T. M. A kinase-independent role for the Rad3(ATR)-Rad26(ATRIP) complex in recruitment of Tel1(ATM) to telomeres in fission yeast. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 2, p. e1000839, 2010.
- SUGASAWA, K. et al. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 642–653, 2009.
- SUGASAWA, K.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F. Cell-free repair of UV-damaged simian virus 40 chromosomes in human cell extracts. I. Development of a cell-free system detecting excision repair of UV-irradiated SV40 chromosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 9098–9104, 1993.
- SULTANA, R. et al. Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Protein Kinase Inhibition Is Synthetically Lethal in XRCC1 Deficient Ovarian Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.
- SUZUKI, H. I. et al. Modulation of microRNA processing by p53. **Nature**, v. 460, p. 529–533, 2009.
- TANABE, H. et al. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4424–4429, 2002.
- TANO, K. et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. **FEBS Letters**, v. 584, p. 4575–4580, 2010.
- TENNYSON, C. N.; KLAMUT, H. J.; WORTON, R. G. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. **Nature Genetics**, v. 9, p. 184–190, 1995.
- TIBBETTS, R. S. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. **Genes & Development**, v. 13, p. 152–157, 1999.
- TOLEDO, L. I. et al. ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1088–1103, 2013.
- TORNALETTI, S. DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 1010–1020, 2009.
- VAN DER KEMP, P. A. et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5197–5202, 1996.
- VAN HOFFEN, A et al. Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 14, p. 2898–2904, 1999.
- VELOSO, A. et al. Genome-wide transcriptional effects of the anti-cancer agent camptothecin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78190, 2013.
- WAGNER, J. M.; KARNITZ, L. M. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 208–214, 2009.
- WAGNER, R.; MESELSON, M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 4135–4139, 1976.
- WALMACQ, C. et al. Mechanism of translesion transcription by RNA polymerase II and its role in cellular resistance to DNA damage. **Molecular Cell**, v. 46, n. 1, p. 18–29, 2012.
- WALWORTH, N.; DAVEY, S.; BEACH, D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. **Nature**, v. 363, p. 368–371, 1993.
- WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 307–320, 2005.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

- WANG, H. et al. ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining. **Cancer Research**, v. 64, p. 7139–7143, 2004.
- 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.
- WARD, I. M.; CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47759–47762, 2001.
- WATANABE, K. et al. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 3886–3896, 2004.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.
- WEI, C.-L. et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 207–219, 2006.
- WELLS, R. D. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 2875–2878, 1996.
- WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 8, p. 129–138, 2009.
- WILLIS, J. et al. APE2 is required for ATR-Chk1 checkpoint activation in response to oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 110, n. 26, p. 10592–10597, 2013, 2013.
- WILSON, J. H.; BERGET, P. B.; PIPAS, J. M. Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. **Molecular and Cellular Biology**, v. 2, p. 1258–1269, 1982.
- WITKIN, E. M. Thermal enhancement of ultraviolet mutability in a tif-1 uvrA derivative of Escherichia coli B-r: evidence that ultraviolet mutagenesis depends upon an inducible function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 1930–1934, 1974.
- WOOLLONS, A. et al. Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblasts after exposure to artificial tanning lamps. **The British Journal of Dermatology**, v. 137, p. 687–692, 1997.
- WU, X. et al. Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 2997–3005, 2006.
- WU, X. et al. ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. **Oncogene**, v. 26, n. 5, p. 757–764, 2007.
- XIE, X. et al. Autophagy is induced through the ROS-TP53-DRAM1 pathway in response to mitochondrial protein synthesis inhibition. **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1071–1084, 2012.
- ZENTNER, G. E. et al. Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 4949–4960, 2011.
- ZHANG, H. et al. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. **Oncology Reports**, v. 24, n. 5, p. 1363–1369, 2010.
- ZHANG, X. et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. **Nature Genetics**, v. 44, n. 5, p. 593–597, 2012.
- ZHAO, M. et al. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 18, p. 3778–3786, 2003.
- ZHOU, B. S.; ANDERSON, H. J.; ROBERGE, M. Targeting DNA checkpoint kinases in cancer therapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S16–22, 2003.
- ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1542–1548, 2003.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002

5.3 APÊNDICE A - SÚMULA CURRICULAR

5.3.1 PRÊMIOS E HONRAS EM CONGRESSOS

1. **Premiado como melhor painel - Andrade-Lima LC**, Veloso A, Paulsen M, Prasad J, Menck CFM, Wilson T, Ljungman M. “Genome-wide assessment of transcriptional recovery following exposure to UV light” trabalho apresentado na 5th Meeting on Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, São Paulo, SP, Brasil, de 31 de Outubro a 02 de Novembro de 2013.
2. **Selecionado para apresentação oral - Andrade-Lima LC**, Veloso A, Paulsen M, Prasad J, Menck CFM, Wilson T, Ljungman M. “Genome-wide assessment of transcriptional recovery following exposure to UV light” trabalho apresentado na 11th International Conference of Environmental Mutagens Foz do iguaçu, PR, Brasil, de 03 a 08 de novembro de 2013.
3. **EMS Student and New Investigator Travel Awards 2012 (Environmental Mutagen Society)** e selecionado para apresentação oral - **Andrade-Lima, L. C.** ; Prasad J; Veloso A, Paulsen M, , Menck CFM, Wilson T, Ljungman M. “Genome-wide assessment of DNA Repair and Transcriptional Recovery following Exposure to UV light”. 2012.
4. **Menção honrosa – Iniciação científica - Andrade-Lima, LC**; Lima-Bessa, KM e Menck, CFM. “Estudo da sensibilidade de células humanas, proficientes e deficientes em reparo e tolerância a lesões, induzidas por radiação ultravioleta B”. Painél apresentado no 53o Congresso Brasileiro de Genética 2007.

5.3.2 ARTIGOS PUBLICADOS

1. **Andrade-Lima, LC**. O Jogo da Resposta ao Dano no DNA. Revista Genética na Escola. 2014. Vol IX (Seção Material didático);
2. Artur Veloso; Benjamin Biewen; Michelle Paulsen; **Leonardo Carmo de Andrade-Lima**; Jayendra Prasad; Karan Bedi; Thomas Wilson; Mats Ljungman. Genome-Wide Transcriptional Effects of the Anti-Cancer Agent Camptothecin. PLoS One. 2013 Oct 23;8(10):e78190.
3. Maria Berra C, de Oliveira CS, Machado Garcia CC, Reily Rocha CR, Koch Lerner L, de **Andrade Lima LC**, da Silva Baptista M, Martins Menck CF. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. Free Radic Biol Med. 2013 Apr 6;61C:343-356
4. Kobayashi GS, Alvizi L, Sunaga DY, Francis-West P, Kuta A, Almada BV, Ferreira SG, de **Andrade-Lima LC**, Bueno DF, Raposo-Amaral CE, Menck CF, Passos-Bueno MR. Susceptibility to DNA damage as a molecular mechanism for non-syndromic cleft lip and palate. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e65677

MATERIAIS DIDÁTICOS

O Jogo da Resposta ao Dano no DNA

Leonardo Carmo de Andrade Lima

Pós-graduando do Departamento de Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Correspondência - leolima11@gmail.com

Genome-Wide Transcriptional Effects of the Anti-Cancer Agent Camptothecin

Artur Veloso^{1,2}, Benjamin Biewen^{1,3}, Michelle T. Paulsen¹, Nathan Berg¹, Leonardo Carmo de Andrade Lima^{1,4}, Jayendra Prasad¹, Karan Bedi^{1,5}, Brian Magnuson¹, Thomas E. Wilson^{6,7}, Mats Ljungman^{1,5*}

1 Department of Radiation Oncology, University of Michigan Comprehensive Cancer Center and Translational Oncology Program, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, United States of America, **2** Bioinformatics Program and Department of Computational Medicine and Bioinformatics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, United States of America, **3** Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota, United States of America, **4** University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **5** Department of Environmental Health Sciences, School of Public Health, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, United States of America, **6** Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, United States of America, **7** Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, United States of America

Abstract

The anti-cancer drug camptothecin inhibits replication and transcription by trapping DNA topoisomerase I (Top1) covalently to DNA in a "cleavable complex". To examine the effects of camptothecin on RNA synthesis genome-wide we used Bru-Seq and show that camptothecin treatment primarily affected transcription elongation. We also observed that camptothecin increased RNA reads past transcription termination sites as well as at enhancer elements. Following removal of camptothecin, transcription spread as a wave from the 5'-end of genes with no recovery of transcription apparent from RNA polymerases stalled in the body of genes. As a result, camptothecin preferentially inhibited the expression of large genes such as proto-oncogenes, and anti-apoptotic genes while smaller ribosomal protein genes, pro-apoptotic genes and p53 target genes showed relative higher expression. Cockayne syndrome group B fibroblasts (CS-B), which are defective in transcription-coupled repair (TCR), showed an RNA synthesis recovery profile similar to normal fibroblasts suggesting that TCR is not involved in the repair of or RNA synthesis recovery from transcription-blocking Top1 lesions. These findings of the effects of camptothecin on transcription have important implications for its anti-cancer activities and may aid in the design of improved combinatorial treatments involving Top1 poisons.

Citation: Veloso A, Biewen B, Paulsen MT, Berg N, Carmo de Andrade Lima L, et al. (2013) Genome-Wide Transcriptional Effects of the Anti-Cancer Agent Camptothecin. PLoS ONE 8(10): e78190. doi:10.1371/journal.pone.0078190

Editor: Didier Auboeuf, INSERM, France

Received: June 5, 2013; **Accepted:** September 2, 2013; **Published:** October 23, 2013

Copyright: © 2013 Veloso et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by funds from National Institute of Environmental Sciences (1R21ES020946) and National Human Genome Research Institute (1R01HG006786). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ljungman@umich.edu

Introduction

DNA topoisomerase I (Top1) relaxes torsional tension that is generated in the DNA helix as a consequence of replication, transcription and chromatin remodeling [1,2]. The Top1-mediated reaction involves covalent binding to DNA, cleavage of one strand of the DNA helix followed by the passing of the other strand through the break and finally the resealing of the DNA strand break. The anti-cancer drug camptothecin specifically inhibits Top1 [3] by acting prior to the resealing step, effectively trapping Top1 covalently bound to the DNA in a "cleavable complex." Camptothecin and other Top1 poisons are used for the treatment of ovarian, cervical, colon, pancreatic, lung, breast, prostate and brain cancers [4]. The anti-cancer activity of camptothecin is linked to replication-mediated toxicity [5]. The inhibitory effect of camptothecin on

transcription has also been acknowledged to contribute to toxicity in non-dividing cells [6,7].

We previously showed that camptothecin-stabilized Top1-DNA complexes retard elongation but not initiation of transcription [8]. In fact, we observed an increased occupancy of RNA polymerase II in the promoter region of the *DHFR* gene correlating to an increased rate of initiation of transcription [8]. In response to transcription elongation blockage, Top1 is targeted for degradation in an ubiquitin-dependent manner [9] and subsequent residual DNA-bound amino acid residues may require the action of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) for their removal in order for transcription elongation to resume [10]. Blockage of the transcription machinery by Top1 complexes trapped on DNA by camptothecin has been shown to lead to the induction of DNA double strand breaks [6] and the formation of DNA-RNA hybrid structures (R-loops)

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue

Carolina Maria Berra^a, Carla Santos de Oliveira^c, Camila Carrião Machado Garcia^a,
Clarissa Ribeiro Reily Rocha^a, Letícia Koch Lerner^a, Leonardo Carmo de Andrade Lima^a,
Maurício da Silva Baptista^b, Carlos Frederico Martins Menck^{a,*}

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^c Center of Health and Biological Sciences, University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2012

Received in revised form

20 February 2013

Accepted 28 March 2013

Available online 6 April 2013

Keywords:

Oxidized DNA damage

Methylene blue photo-excitation

Nucleotide excision repair

XP-A

XP-C

Free radicals

ABSTRACT

The nucleotide excision repair (NER) mechanism is well known to be involved in the removal of UV-induced lesions. Nevertheless, the involvement of this pathway in the repair of lesions generated after DNA oxidation remains controversial. The effects of visible-light-excited methylene blue (MB), known to generate reactive oxygen species (ROS), were examined directly in xeroderma pigmentosum (XP)-A and XP-C NER-deficient human fibroblasts. Initially, MB was confirmed as being incorporated in similar amounts by the cells and that its photoexcitation induces the generation of ¹O₂ within cells. The analysis of cell survival indicated that NER-deficient cells were hypersensitive to photoactivated MB. This sensitivity was confirmed with cells silenced for the XPC gene and by host-cell reactivation (HCR) of plasmid exposed to the photosensitizing effects of photoexcited MB. The sensitivity detected by HCR was restored in complemented cells, confirming the participation of XPA and XPC proteins in the repair of DNA lesions induced by photosensitized MB. Furthermore, DNA damage (single- and double-strand breaks and alkali-sensitive sites) was observed in the nuclei of treated cells by alkaline comet assay, with higher frequency of lesions in NER-deficient than in NER-proficient cells. Likewise, NER-deficient cells also presented more γ-H2AX-stained nuclei and G2/M arrest after photoactivated MB treatment, probably as a consequence of DNA damage response. Notwithstanding, the kinetics of both alkali- and FPG-sensitive sites repair were similar among cells, thereby demonstrating not only that MB photo-excitation generates nuclear DNA damage, but also that the removal of these lesions is NER-independent. Therefore, this work provides further evidence that XPA and XPC proteins have specific roles in cell protection and repair/tolerance of ROS-induced DNA damage. Moreover, as XPC-deficient patients do not present neurodegeneration, premature aging, or developmental clinical symptoms, the results indicate that defects in the repair/tolerance of oxidatively generated DNA lesions are not sufficient to explain these severe clinical features of certain XP patients.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Genetic information in organisms is constantly exposed to the damaging effects of environmental and endogenous genotoxic agents, chemical instability, imperfection of DNA metabolizing processes, and spontaneous alterations. Thus, the integrity of genomic DNA is frequently threatened, even in perfectly healthy cells. To deal with deleterious damage, an intricate network of DNA repair systems evolved early in evolution. One of these, nucleotide excision repair (NER), is a highly versatile and sophisticated DNA

damage removal pathway that counteracts the deleterious effects of a multitude of structurally unrelated DNA lesions [1].

NER is involved in the removal of lesions that, in addition to distorting the DNA double helix, interfere in base pairing and block DNA duplication and transcription. The most common examples of these lesions are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6–4) pyrimidone photoproducts (6–4 PPs), the two major injuries caused by ultraviolet (UV) B light, other than various bulky adducts induced by chemical agents [2,3]. Even though NER is generally thought of as a repair system for bulky adducts, it has been proposed that it works with moderate efficiency on nonbulky DNA lesions, such as DNA bases altered by oxidative stress, that are usually processed by base excision repair (BER) [4].

* Corresponding author. Fax: + 55 11 30917354.

E-mail address: cfmmenck@usp.br (C.F. Martins Menck).

Susceptibility to DNA Damage as a Molecular Mechanism for Non-Syndromic Cleft Lip and Palate

Gerson Shigeru Kobayashi^{1,3}, Lucas Alvizi^{1,3}, Daniele Yumi Sunaga¹, Philippa Francis-West², Anna Kuta², Bruno Vinícius Pimenta Almada¹, Simone Gomes Ferreira¹, Leonardo Carmo de Andrade-Lima³, Daniela Franco Bueno^{1,4}, Cássio Eduardo Raposo-Amaral⁴, Carlos Frederico Menck³, Maria Rita Passos-Bueno^{1*}

1 Human Genome Research Center, Institute for Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Dental Institute, Department of Craniofacial Development and Stem Cell Biology, King's College London, London, United Kingdom, **3** Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** SOBRAPAR Institute, Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

Non-syndromic cleft lip/palate (NSCL/P) is a complex, frequent congenital malformation, determined by the interplay between genetic and environmental factors during embryonic development. Previous findings have appointed an aetiological overlap between NSCL/P and cancer, and alterations in similar biological pathways may underpin both conditions. Here, using a combination of transcriptomic profiling and functional approaches, we report that NSCL/P dental pulp stem cells exhibit dysregulation of a co-expressed gene network mainly associated with DNA double-strand break repair and cell cycle control ($p = 2.88 \times 10^{-2}$ – 5.02×10^{-9}). This network included important genes for these cellular processes, such as *BRCA1*, *RAD51*, and *MSH2*, which are predicted to be regulated by transcription factor E2F1. Functional assays support these findings, revealing that NSCL/P cells accumulate DNA double-strand breaks upon exposure to H_2O_2 . Furthermore, we show that *E2f1*, *Brca1* and *Rad51* are co-expressed in the developing embryonic orofacial primordia, and may act as a molecular hub playing a role in lip and palate morphogenesis. In conclusion, we show for the first time that cellular defences against DNA damage may take part in determining the susceptibility to NSCL/P. These results are in accordance with the hypothesis of aetiological overlap between this malformation and cancer, and suggest a new pathogenic mechanism for the disease.

Citation: Kobayashi GS, Alvizi L, Sunaga DY, Francis-West P, Kuta A, et al. (2013) Susceptibility to DNA Damage as a Molecular Mechanism for Non-Syndromic Cleft Lip and Palate. PLoS ONE 8(6): e65677. doi:10.1371/journal.pone.0065677

Editor: Dale J. Hedges, University of Miami, United States of America

Received: December 20, 2012; **Accepted:** April 26, 2013; **Published:** June 12, 2013

Copyright: © 2013 Kobayashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is funded by CNPq (National Council of Technological and Scientific Development), FAPESP (São Paulo Research Foundation), CAPES (Higher Education Co-Ordination Agency) and MCT (Ministry of Science, Technology and Innovation). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: passos@ib.usp.br

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P [OMIM 119530]) is one of the most common congenital defects. Its birth prevalence is variable, ranging from 3.4 to 22.9 per 10,000 births world-wide, depending upon factors such as ethnic background, geographical location, and socio-economic status [1].

The interplay between genetic and environmental factors during embryonic development is thought to be determinant in the aetiology of NSCL/P. Genome-wide association studies (GWAS) have enabled the consistent identification of several candidate *loci*. However, the low attributed risk for each variant fails to explain the estimated heritability for NSCL/P (as high as 85% in some populations [2]), and little is known about their functional role in the pathogenesis of the disease. The fact that non-coding genomic regions harbour many of these variants (which include an enhancer upstream of *IRF6*, and intronic and intergenic regions [3,4,5,6]) is indicative that they might play a transcriptional regulatory role in the embryo, in agreement with the idea that alterations in gene expression may be a relevant mechanism underlying susceptibility to complex diseases [7].

Therefore, if disease susceptibility is shaped by transcriptional anomalies, which in turn are driven by the individual's genetic constitution, a feasible approach to investigate the aetiology of NSCL/P is the gene expression analysis of cells from affected individuals. This strategy not only allows the screening of candidate biological pathways contributing to the disease, but also enables the investigation of environmental agents and how they affect these pathways. Previous data derived from fibroblasts and mesenchymal stem cells support this rationale, as they revealed alterations in gene networks functionally relevant for orofacial development, such as collagen metabolism and extracellular matrix remodelling [8,9,10,11].

NSCL/P is thought to arise from anomalies in cell migration, proliferation, transdifferentiation and apoptosis [12,13,14], all of which are known to be involved in cancer progression. The relationship between orofacial clefts and cancer is subject of debate; however, several studies have reported co-occurrence of orofacial clefts and a variety of cancer types. [15,16,17,18]. Accordingly, alterations in genes that are known to play diverse roles during carcinogenesis, such as *CDH1*, *TP63*, *NBS* and *AXIN2*, have been related to both syndromic and non-syndromic