

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FERNANDA TEIXEIRA ROWIES

**Caracterização da expressão de vias de reparo e medida de dano
ao DNA em epitélio olfatório de camundongos**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

07/08/2019

FERNANDA TEIXEIRA ROWIES

**Caracterização da expressão de vias de reparo e medida de dano
ao DNA em epitélio olfatório de camundongos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Nadja
Cristhina de Souza Pinto

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R882c Rowies, Fernanda Teixeira
Caracterização da expressão de vias de reparo e medida de dano ao DNA em epitélio olfatório de camundongos / Fernanda Teixeira Rowies. - São Paulo, 2019.
77 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Souza-Pinto, Nadja Cristhina de

1. neurônios olfatórios. 2. reparo de DNA. 3. RT-PCR. 4. PCR de longa extensão. 5. neurodegeneração.
I. T. II. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, orientador.

*Dedico a todas as mulheres cientistas,
especialmente as brasileiras*

AGRADECIMENTOS

A pós-graduação é bruta. Vivenciá-la é uma eterna mistura de sentimentos de orgulho, pertencimento, contribuição e cooperação, mas também de muita solidão, dúvida e um senso exacerbado de responsabilidade que por vezes beira culpa e medo. Nos corredores, nós nos apoiamos, dizendo que é assim mesmo. Como disse um pesquisador a quem respeito muito, Prof. Ben Van Houten, em um congresso que tive o prazer e o privilégio de participar ao longo dessa jornada, “*Science is a series of bad months, and a few good days. This is one of the good days*”. Este documento é um dos dias bons. E eu não teria chegado neste dia bom, não fossem as pessoas que caminharam ao meu lado e me seguraram, durante os meses ruins.

Agradeço de coração, de corpo e alma à minha família. Meus pais, Maria Cristina e Luís Fernando pela vida, pelo incentivo aos estudos desde sempre e pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões. Por todos os conselhos sobre o melhor caminho a seguir e por respeitarem as escolhas que fiz ao trilhar próprio caminho, mesmo discordando de algumas. Eu não poderia ter nascido de dupla melhor. Às minhas gêmeas Júlia e Beatriz, por serem um porto seguro, uma fonte inesgotável de referências à uma infância muito feliz e por me permitirem muitas vezes visualizar várias versões de mim mesma, e me lembrarem constantemente que posso ser várias coisas e ser eu mesma a todo o tempo. A meus novos irmãos recém-chegados, Ricardo e Mavi, pelo carinho e pela leveza e respeito com os quais incorporaram nosso núcleo Rowies. Eu tenho muita sorte.

À Prof. Nadja Cristhina de Souza Pinto, minha orientadora, por me acolher como filha científica desde a época de graduação. Agradeço pela paciência, pelo constante incentivo à excelência, por todas as palavras de consolo. Admiro sua forma de fazer ciência e tomo sua carreira científica e sua postura na vida como fontes de inspiração.

À Prof. Bettina Malnic, minha co-orientadora, por tornar mais possível a minha aproximação com a neurociência e aceitar me orientar neste trabalho. Agradeço pela paciência, disponibilidade e pela oportunidade de contribuir.

Aos colegas do Laboratório de Genética Mitocondrial; em especial os irmãos científicos Felipe Truglio, Rebeca Alencar, Rebeca Bueno, Laís Yoshie, aos doutores Carolina Parga e Mateus Mori, e à técnica Adriana Wendel, por serem minha melhor companhia nesses meses todos. Por toda a ajuda em todos os sentidos, de protocolos, experimentos e estudos a

conversas profundas sobre a vida, o futuro, *Game Of Thrones* e Netflix. Teria sido imensamente mais difícil sem vocês.

Aos colegas do Laboratório de Neurociência Molecular; em especial Cassandra Lyra, Thiago Nakahara e à técnica Érica Bandeira, por toda a ajuda e contribuição para este trabalho com relação às amostras e protocolos de hibridização *in situ*. Agradeço também pelo carinho, solicitude e boa companhia.

À Sara Santana, por ter chegado, por ter ficado e tornar meus dias mais leves.

Ao grande amigo e mentor Alexandre Redondo, por ter sempre as melhores palavras de incentivo na ponta da língua que me clarearam sempre que precisei.

Aos ex-companheiros de casa (muito saudosa e querida) Rodrigo Veras, Armando Nader e Gabriel Septon, por tornarem minha rotina mais leve num período difícil.

Aos amigos que em algum momento acompanharam este processo muito de perto. Apesar de não entenderem muito bem o que eu faço, vibram em sintonia comigo nos dias bons e não me fazem perguntas antes de me consolarem nos meses ruins. Alana Neres, Aline Bernal, Camila Felix, Cássia Bandeira, Fernanda Haddad, Gabriel Kasparevicis, Giovanna Arone, Halinne Piccioni, Paula Sayuri, Roberta Russo, Tamyres Funcia, Thais Fontebassi, Thatyane Rezende, Vinicius Corrêa. A Mauritz de Vries, pelo apoio e incentivo no início de tudo, que não esqueci e não poderia deixar de agradecer.

À FAPESP pelo financiamento deste trabalho através de Auxílio à Pesquisa – Projeto Temático (2017/04372-0) e Bolsa de Mestrado (2017/13723-1).

RESUMO

Rowies, F. T. **Caracterização molecular de reparo de DNA em epitélio olfatório de camundongos.** 2019. 76 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As primeiras células responsáveis pela percepção olfatória são os neurônios olfatórios (OSNs) presentes no epitélio olfatório (EO) da cavidade nasal, que reconhecem moléculas voláteis presentes no ar, denominadas odorantes, através de receptores específicos. Diferentemente de neurônios do sistema nervoso central (SNC), que estão relativamente protegidos de genotoxinas exógenas, OSNs estão em constante contato com agentes potencialmente genotóxicos, incluindo o oxigênio atmosférico. Além disto, em contraste com a maioria dos neurônios do SNC, OSNs são periodicamente repostos através de neurogênese adulta, portanto, possuem um tempo de vida menor do que outros neurônios. A função olfatória diminui durante o envelhecimento normal e patológico, através de mecanismos que ainda não estão totalmente claros. Em doenças neurodegenerativas, a perda do olfato é um dos sintomas iniciais e é utilizada como marcador de resposta a alguns tratamentos. Relações causais entre deficiências em reparo de DNA e neurodegeneração já foram demonstradas em vários modelos experimentais. No entanto, ainda não se sabe se alterações nessas vias contribuem para a perda olfatória observada nessas condições, provavelmente porque não há dados disponíveis na literatura sobre vias de reparo de DNA em OSNs. Por isso, o objetivo deste estudo foi caracterizar as vias de reparo de DNA presentes em populações de OSNs maduros e seus precursores. Analisamos dados de expressão de genes de reparo extraídos de dois transcriptomas diferentes, um relacionado à idade e outro, ao estágio de diferenciação destes neurônios. Em seguida, validamos os resultados obtidos da análise *in silico* através de PCR em tempo real utilizando amostras de EO de camundongos da linhagem C57BL/6J em duas idades (neonatos e com três semanas de idade). Nossos resultados indicam que OSNs são proficientes em todas as vias de reparo de excisão analisadas, apresentando expressão detectável de genes essenciais de cada via. A comparação entre populações enriquecidas em precursores ou em neurônios maduros, nas duas análises, sugere que a atividade de pelo menos quatro vias de reparo de excisão é menor em camundongos jovens, quando comparados aos neonatos, sugerindo, portanto, que há diminuição na expressão durante a diferenciação destas células. Esta observação vai corroborar com dados da literatura que mostraram que a expressão e atividade de proteínas de reparo em células proliferativas é maior do que em células

terminalmente diferenciadas. Para testar a hipótese de que, por estarem em constante contato com agentes genotóxicos, OSNs acumulam mais lesões em DNA do que células no SNC, comparamos os níveis de lesões em DNA obtido de amostras de EO e de bulbo olfatório (BO), e de córtex temporal (CT), uma região cerebral que não apresenta taxas significativas de neurogênese e não expostas ao ambiente externo. A taxa de lesão foi calculada a partir de dados obtidos por PCR de longa extensão. Resultados obtidos utilizando EO, BO e CT de camundongos com três semanas de idade mostram que a amplificação em amostras de CT é muito menor do que em EO ou BO, sugerindo que neurônios do SNC acumulam mais lesões do que neurônios de regiões que apresentam neurogênese, mesmo que estas estejam constantemente expostas a agentes genotóxicos exógenos. Além disso, a eficiência de amplificação de fragmentos longos de DNA mitocondrial (mtDNA) foi menor em EO do que em BO, sugerindo que a constante exposição ao oxigênio atmosférico contribui para o acúmulo de lesões ao mtDNA, que é mais suscetível do que o DNA nuclear. Esse trabalho demonstra, pela primeira vez, que OSNs expressam proteínas essenciais de vias de reparo de DNA, cuja expressão decresce durante o processo de maturação dos neurônios olfatórios. Esses resultados devem contribuir para o entendimento dos mecanismos de manutenção da integridade genômica nestas células tão únicas.

Palavras-chave: neurônios olfatórios, reparo de DNA, RT-PCR, PCR de longa extensão, neurodegeneração.

ABSTRACT

Rowies, F. T. **Molecular characterization of DNA repair in mouse olfactory epithelium.** 2019. 76 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The first cells responsible for olfactory perception are the olfactory sensory neurons (OSNs), located in the olfactory epithelium (OE) in the nasal cavity, which recognize volatile molecules in the air, called odorants, through olfactory receptors. Unlike neurons located in the central nervous system (CNS), which are relatively protected from exogenous toxins, OSNs are in constant contact with genotoxic agents, including atmospheric oxygen. Moreover, in contrast with most neurons in CNS, OSNs are periodically replaced through adult neurogenesis, therefore, having shorter lifespan than most neurons. Olfactory function decreases during normal and pathological aging, through mechanisms that are still not fully understood. In neurodegenerative diseases, olfactory loss is an early symptom and, in some cases, is used as a treatment response marker. DNA repair defects have been causally linked with neurodegeneration in different experimental models. However, it is still unclear whether DNA repair alterations contribute to olfactory loss in these conditions, probably because there are no data available on DNA repair dynamic in OSNs. Therefore, our goal was to characterize the DNA repair pathways present in precursor and mature OSNs populations. We analyzed gene expression data from age-related and differentiation stage-related transcriptomes of these neurons, and validated the results by real time PCR using mouse OE samples from C57BL/6J lineage in two different ages (newborns and three weeks old). Our results indicate that OSNs are proficient in all DNA repair pathways investigated, showing detectable expression of essential genes from each pathway. When comparing populations enriched for mature OSNs or its precursors, our results suggest that the activities of at least four repair pathways are lower in young mice than in newborns, suggesting that DNA repair expression decreases during OSNs differentiation. This observation is consistent with published data showing that the expression and activities of repair proteins is lower in terminally differentiated than in proliferative cells. To test the hypothesis that OSNs would accumulate more DNA damage than CNS neurons, since they are in constant contact with genotoxic agents, we compared DNA damage levels in nuclear and mitochondrial DNA from OE, olfactory bulb (OB), and temporal cortex (TC) samples. We chose to use the TC region and a non-olfactory related control as it does not show significant adult neurogenesis and it is not exposed to external environment. Lesion rate was

calculated from data obtained by long extension PCR. Results from 3 weeks old mice OE, OB and TC samples showed that the amplification in TC samples is much lower than OE or OB samples, suggesting that neurons in CNS accumulate more damage than neurons that undergo neurogenesis. Besides, lesion frequency was higher in OE mitochondrial DNA (mtDNA) than in OB, suggesting that the constant exposure to atmospheric oxygen may contribute to accumulation of mtDNA lesions. This work demonstrates, for the first time, that OSNs are proficient in at least four DNA repair pathways, and that expression of key genes in these pathways decreases with differentiation. These results will contribute to better our understanding of the mechanisms involved in genomic stability in such unique cell types.

Key-words: olfactory sensory neurons, DNA repair, RT-PCR, long extension PCR, neurodegeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SILGAS

APE1 (APEX1)	AP endonuclease 1
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina sal
BER	Reparo via excisão de bases
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BO	Bulbo olfatório
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibillity protein</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibillity protein</i>
C2C12	Subclone de linhagem celular imortalizada de mioblastos de camundongo
C57BL/6J	Linhagem isogênica de camundongos
cDNA	DNA complementar
CSB (ERCC6)	DNA excision repair protein ERCC-6
CT	Córtex temporal (região arbitrária)
DEPC	Dicarbonato de dietila
DNA PKcs	Subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA
EDTA	Ácido etineldiamino tetra-acético
EO	Epitélio olfatório
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Exo1	Exonuclease 1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FPKM	Fragmentos por kilobase por milhão de transcritos
HCl	Ácido clorídrico
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase 1
HR	Reparo via recombinação homóloga
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de potássio
Ku70 (XRCC6)	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>
Ku80 (XRCC5)	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>
LIG4	DNA ligase 4
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
MT-RNR1	<i>Mitochondrially encoded 12S RNA</i>
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitrozul de tetrazólio

nDNA	DNA nuclear
NER	Reparo via excisão de nucleotídeos
Ngn1	Neurogenina 1
NHEJ	Reparo via junção de pontas não homólogas
OGG1	8-oxo-guanina DNA glicosilase
OMP	<i>Olfactory protein marker</i>
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POLB	DNA polimerase β
POLD	DNA polimerase δ
PVA	Álcool polivinílico
Rad52	DNA repair protein RAD52 homolog
Ric8B	<i>Synembryn-B</i> (fator de troca de nucleotídeo guanina B)
RNAse-free	Livre de RNAses
SP6	Fator de transcrição SP6
SSC	Tampão sódio – salino – citrato
T7	T7 RNA polimerase
TAE	Tampão Tris – ácido bórico – EDTA
TNB	Tampão Tris – HCl – NaCl – PerkinElmer FP1020
TNT	Tampão Tris-NaCl-Tween20
TRIS	(Hidroximetil)aminometano
UDG (UNG)	Uracil DNA glicosilase
XPA	<i>DNA repair protein complementing XP-A cells homolog</i>
XPC	<i>DNA repair protein complementing XP-C cells homolog</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. A instabilidade do DNA requer mecanismos de reparo.....	14
1.1.1. Reparo via excisão de bases (BER).....	15
1.1.2. Reparo via excisão de nucleotídeos (NER).....	17
1.1.3. Reparo de quebras de dupla fita (DSBR).....	19
1.1.4. Reparo de pareamentos errôneos (MMR).....	21
1.1.5. Patologias associadas à deficiência de reparo de DNA.....	22
1.1.6. Lesões oxidadas ao DNA.....	24
1.2. As bases moleculares do olfato.....	25
1.2.1. Neurônios olfatórios são um tipo particular de neurônios.....	27
1.2.2. Função olfatória, envelhecimento e neurodegeneração.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. METODOLOGIA.....	31
3.1. Análise <i>in silico</i> : transcriptomas.....	33
3.2. Medida do padrão de expressão gênica das vias de reparo de DNA.....	33
3.2.1. Obtenção das amostras.....	33
3.2.2. Preparação das amostras.....	34
3.2.3. Reações de transcrição reversa e análise quantitativa de cDNA.....	35
3.3. Localização espacial das proteínas de reparo em cortes histológicos de EO.....	37
3.3.1. Preparação de lâminas.....	37
3.3.2. Síntese de ribossondas.....	38
3.3.3. Hibridização <i>in situ</i>	39

3.4. Medida do número de lesões em DNA.....	40
3.4.1. PCR de longa extensão.....	40
3.5. Análises estatísticas.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Análise <i>in silico</i> de genes de reparo de DNA em EO de camundongos.....	44
4.2. Análise da expressão de genes de reparo por PCR em tempo real.....	47
4.2.1. Amostras utilizadas na padronização dos primers.....	47
4.2.2. Marcadores olfatórios.....	48
4.2.3. Validação das análises <i>in silico</i> para a expressão de genes de reparo.....	49
4.3. Análise da expressão de genes de reparo por hibridização <i>in situ</i>	52
4.4. Análise de lesões em DNA de OSNs por PCR de longa extensão.....	53
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	68
8. APÊNDICES.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 A instabilidade do DNA requer mecanismos de reparo

O DNA é uma molécula orgânica complexa presente em uma grande variedade de organismos, que carrega consigo toda a informação genética de um indivíduo e que é transmitida deste para seus descendentes. Seu papel biológico como repositório e veículo de informação pressupõe estabilidade tanto química quanto estrutural. Isto é, para que os indivíduos de uma espécie prosperem, tanto enquanto indivíduos, quanto como espécie, é essencial que todas as moléculas de DNA não sofram alterações que resultem em patologias durante a vida de um indivíduo e nos processos que envolvem sua reprodução. No entanto, estudos sobre o metabolismo do DNA revelaram sua dinamicidade, concluindo que o DNA não é uma molécula totalmente estável (revisado em Friedberg, 2003). As modificações que podem ocorrer em sua estrutura são bastante variadas (**Figura 1**). Alguns dos tipos de lesão mais comuns são pequenas modificações covalentes, como alquilação, oxidação ou desaminação de uma das quatro bases do DNA (adenina, citosina, guanina e timina), que não afetam significativamente a estrutura da dupla-hélice. Outras modificações mais complexas podem distorcer a estrutura em dupla-hélice, como dímeros formados pela luz UV, a ligação covalente de hidrocarbonetos cíclicos, ligações covalentes cruzadas entre fitas ou na mesma fita de DNA. Há, ainda, lesões que envolvem a quebra de uma ou de ambas as fitas do DNA, sendo esta última uma das mais severas lesões, pois pode levar a perda de informação genética. Tais lesões podem surgir decorrentes do metabolismo normal da célula, durante sua replicação ou após eventos de resposta imunológica e inflamação (revisado em Reuter et al, 2010), ou da ação de agentes exógenos como luz ultravioleta, radiação ionizante e moléculas capazes de reagir com o DNA. Se não forem reparadas, estas modificações podem se acumular, podendo levar à morte celular ou gerar mutações, que podem enfim resultar em alterações patológicas como câncer, envelhecimento precoce e neurodegeneração. Desta forma, a existência de vias moleculares que

removam essas lesões (**Figura 1**) antes que elas possam resultar em citotoxicidade ou mutagênese é essencial para a manutenção da vida.

Agentes de dano ao DNA	Agentes alquilantes Desaminação de bases Erros de replicação	Espécies reativas de oxigênio	Radiação ionizante Radiação ultravioleta Compostos aromáticos
Lesões formadas	Erros de pareamento Incorporação de uracila Sítios abásicos Bases alquiladas	Bases oxidadas Quebras de fita (simples e duplas)	Quebras de fita (simples e duplas) Distorções da dupla-hélice por ligações covalentes
Vias de reparo	Reparo de pareamentos errôneos Reparo por excisão de bases	Reparo por excisão de bases Recombinação Homóloga Junção de pontas não-homólogas	Reparo por excisão de nucleotídeos Recombinação Homóloga Junção de pontas não-homólogas

Figura 1: Tipos de lesão ao DNA geradas por diferentes fontes e as vias de reparo associadas. Diferentes vias de reparo podem competir ou agir em conjunto para reparar o mesmo tipo de dano. Algumas lesões podem ser formadas a partir da ação de mais de um agente. As vias de reparo que serão engajadas dependem da natureza da lesão, da ação coordenada da sinalização de reconhecimento dos danos, do estágio de diferenciação celular e do compartimento celular em que o dano será reparado, núcleo ou mitocôndria. Adaptado de Chatterjee e Walker, 2017.

As vias de reparo engajadas podem ser por reversão direta da lesão ou por mecanismos via excisão. Neste trabalho, daremos enfoque às vias mais comuns de reparo por excisão.

1.1.1 Reparo via excisão de bases (BER)

A via de reparo por excisão de bases (BER, *Base Excision Repair*) (**Figura 2**) é responsável pela remoção de pequenas modificações covalentes como alquilações, oxidações/reduções e desaminação de bases, que não alteram significativamente a estrutura da dupla-hélice. A via se processa a partir do reconhecimento e remoção da base modificada por uma DNA glicosilase, gerando um sítio abásico (*apurínico* ou *apirimidínico*, portanto, sítio AP), que é então processado pela atividade AP-liase da glicosilase – para glicosilases

bifuncionais – ou por uma AP endonuclease, gerando uma quebra de fita simples. As pontas remanescentes da quebra são processadas e a via pode seguir por dois caminhos. Na via curta de BER, uma nova base correta é inserida por uma DNA polimerase e a ligação fosfodiéster é novamente estabelecida por uma DNA ligase. Na via longa, uma sequência maior de bases é inserida, deslocando a fita antiga e gerando um *flap*, que é removido por um complexo enzimático, e a então a ligação fosfodiéster é reestabelecida (revisado em Dianov e Hübscher, 2013).

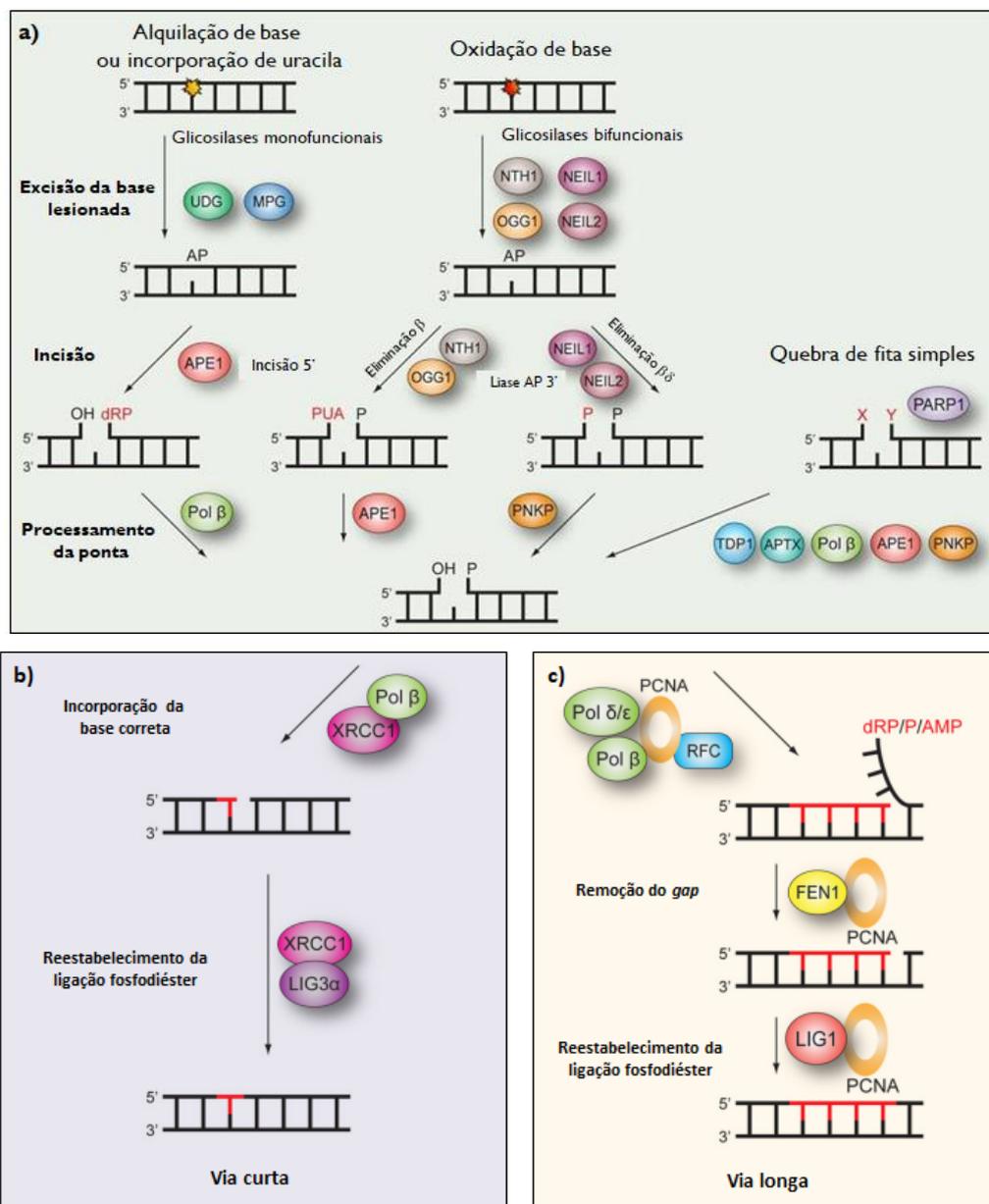


Figura 2: Esquemática geral da via de BER, em que **a)** o reconhecimento da lesão e a remoção da base lesionada ocorre por glicosilases mono ou bifuncionais, dependendo do tipo de dano, gerando um sítio abásico (AP). Glicosilases bifuncionais promovem uma incisão na fita de DNA após

a remoção de base, ao passo que outras endonucleases são responsáveis por este passo no caso da remoção por glicosilases monofuncionais. Um conjunto variado de enzimas faz o processamento das pontas geradas. Danos que causam quebras de fita simples são reparados por BER a partir deste ponto. A via se processa por dois caminhos distintos, sendo **b)** a via curta de BER, com a incorporação da base correta por uma polimerase e reestabelecimento da ligação fosfodiéster e **c)** a via longa, com a incorporação de mais de uma base e posterior remoção do flap formado, antes do reestabelecimento da ligação fosfodiéster. Adaptado de Jeppensen et al., 2011.

1.1.2 Reparo via excisão de nucleotídeos (NER)

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês, *Nucleotide Exision Repair*) (**Figura 3**) é responsável pela remoção de uma variada gama de adutos covalentes que não apresentam conservação estrutural, mas que têm em comum o fato de introduzirem distorções significativas na dupla-hélice de DNA, como dímeros ou fotoprodutos de pirimidina, geralmente provocados por radiação UV, e adutos heterocíclicos. Mecanicamente, essa via consiste na remoção do nucleotídeo lesionado, como parte de um oligonucleotídeo de cerca de 25-30 bases, e substituição por um novo fragmento. Em eucariontes, esta via envolve a ação de cerca de 30 proteínas, que seguem cinco passos básicos sucessivos: reconhecimento da lesão, abertura da dupla hélice de DNA no local da lesão, dupla incisão nas extremidades do oligonucleotídeo contendo a lesão, síntese de DNA a partir da fita molde não danificada e ligação da porção 3' da fita recém-sintetizada à sequência original. A etapa de reconhecimento e localização da lesão pode ocorrer acoplada à transcrição (TCR, do inglês *Transcription Coupled Repair*), em que é dependente do bloqueio de RNA polimerase II; ou independente de transcrição, numa subvia conhecida como reparo do genoma global (GGR, do inglês *Global Genome Repair*), na qual o reconhecimento acontece por proteínas específicas (XPC/Centrin/hRAD23B) (revisado em Marteijn et al, 2014).

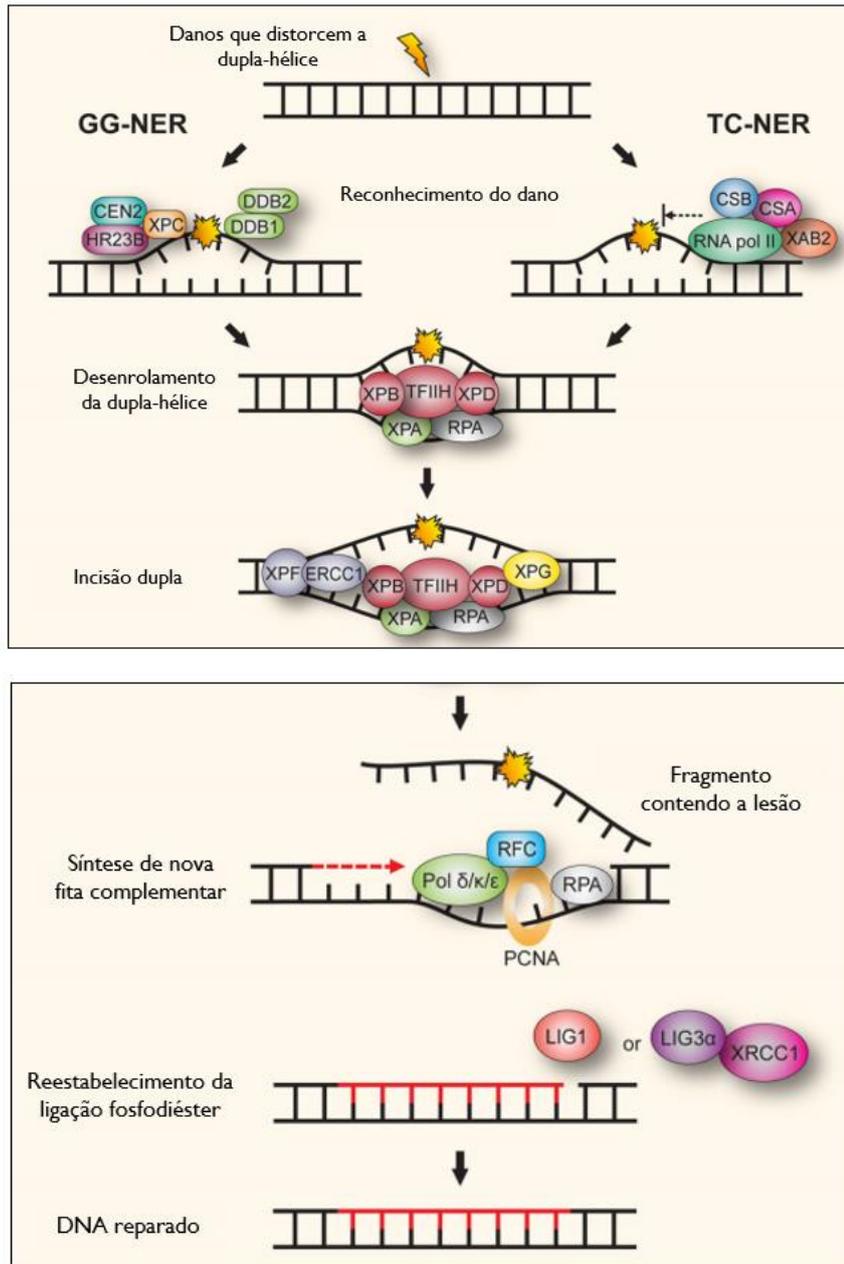


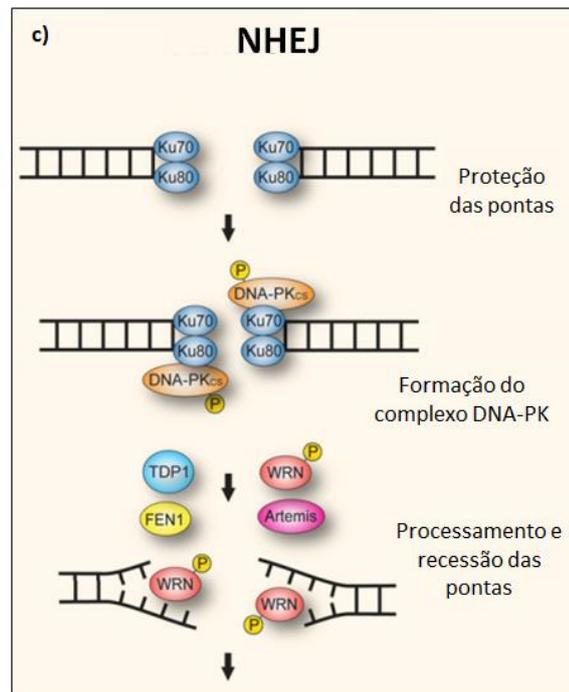
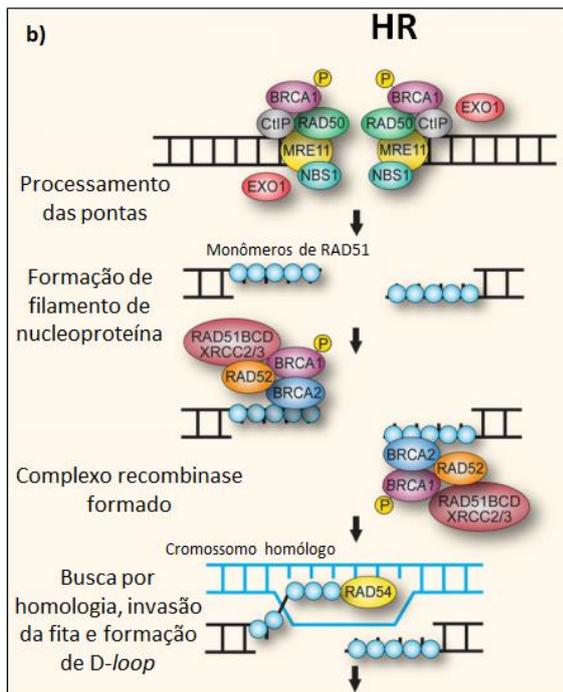
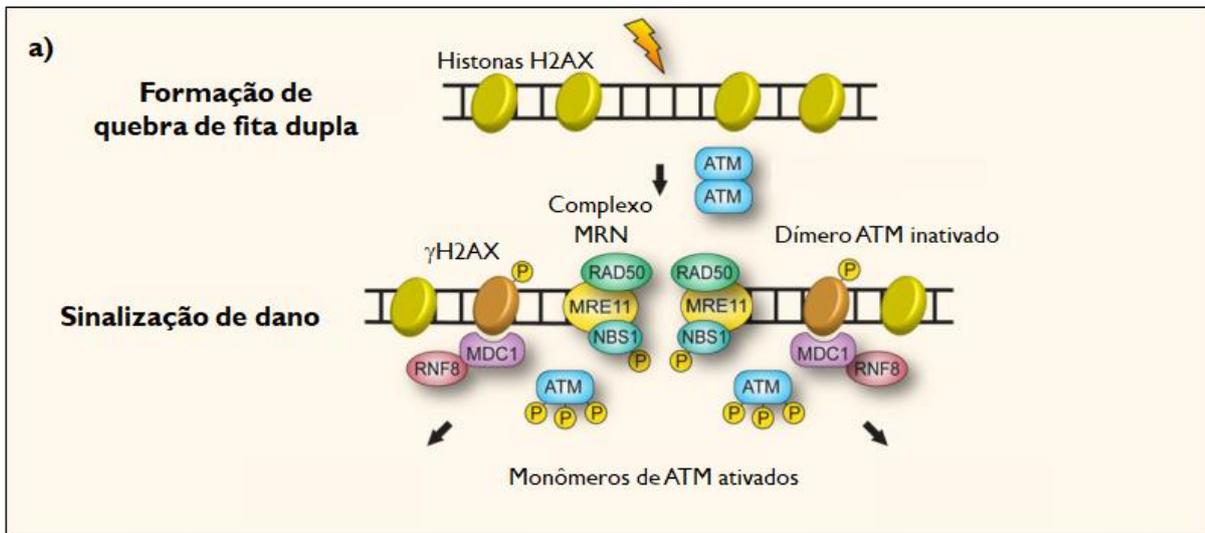
Figura 3: Esquemática geral da via de NER. Após a lesão, em que a formação de ligações covalentes que distorcem a estrutura da dupla-hélice, o reconhecimento ocorre por complexos enzimáticos distintos. No reparo de “genoma global” (GG-NER), independente de transcrição, o reconhecimento é feito através do complexo XPC-HR23B-CEN2. O complexo DDB facilita este reconhecimento pois sua ação promove uma ligeira distorção na dupla hélice. No reparo acoplado à transcrição (TC-NER), o reconhecimento se dá pelo bloqueio da progressão da RNA polimerase II. A partir deste ponto as duas subvias seguem pelo mesmo caminho, em que há o recrutamento de enzimas, incluindo helicases que irão desenrolar as fitas do DNA no sítio da lesão. A ação de duas endonucleases (o complexo XPF-ERCC1 na ponta 5’ e XPG na ponta 3’) promove a incisão dupla e a síntese de nova fita é feita por uma polimerase, assessorada por outras proteínas e o reestabelecimento da ligação fosfodiéster. Adaptado de Jeppensen et al., 2011.

1.1.3 Reparo de quebras de dupla fita (DSBR)

Quebras de dupla fita constituem um dos danos mais grave à estabilidade genômica, pois podem levar a deleções de porções críticas e/ou muito extensas do genoma, bem como a rearranjos cromossômicos e perda de ploidia. As vias de reparo de quebras de dupla fita (DSBR, do inglês, *Double Strand Break Repair*) (**Figura 4**) promovem a ligação das pontas livres restaurando a integridade estrutural, e podem ocorrer por algumas vias mecanisticamente distintas, que podem colaborar ou competir entre si, dependendo da disponibilidade de fitas homólogas ou pequenas regiões de homologia. Em mamíferos, as principais vias que promovem DSBR são a de recombinação homóloga (HR, do inglês *Homologous Recombination*) (**Figuras 4b e 4d**) e a de junção de pontas não homólogas (NHEJ, do inglês *Non Homologous End Joining*) (**Figuras 4c e 4e**).

A via de HR requer a presença de uma fita homóloga para ser utilizada como molde, por isso, está menos sujeita a erros e acredita-se que seja restrita às fases S tardia e G₂ do ciclo celular, em que há presença de fita homóloga da cromátide irmã. Ela começa através do reconhecimento da quebra de uma das fitas por um complexo enzimático que se liga às quebras, seguido da degradação exonucleolítica das pontas 5' gerando um filamento de fita simples de DNA. Estes filamentos são ligados por proteínas que promovem a busca por homologia de sequência. Quando encontrada esta homologia, outras enzimas promovem um *loop* de deslocamento, ou seja, a abertura na dupla hélice da fita de DNA não lesionada, em que o filamento da fita lesionada “invade” na região homóloga, formando uma estrutura conhecida como junção de Holiday. A partir daí, será sintetizado novo DNA na fita lesionada, enquanto que o segundo filamento de DNA ainda não reparado se alinha ao *loop* de deslocamento e sua resolução pode seguir por diferentes caminhos, produzindo produtos *crossover* ou não-*crossover*. A via de NHEJ promove a ligação direta entre as extremidades do DNA, sem a necessidade da utilização de uma fita homóloga como molde, portanto, podendo ocorrer em

qualquer fase do ciclo celular. Esta via segue basicamente quatro passos, que envolvem a participação de diversas enzimas: **(I)** reconhecimento da quebra, recrutamento e estabilização de enzimas do complexo NHEJ nas extremidades; **(II)** estabelecimento da “ponte” entre as pontas de DNA através de inserção de nucleotídeos por uma polimerase; **(III)** processamento das pontas de DNA; **(IV)** restauração da ligação fosfodiéster e dissolução do complexo NHEJ (revisado em Davis e Chen, 2013, Renkawitz *et al.*, 2014, Scully *et al.*, 2019).



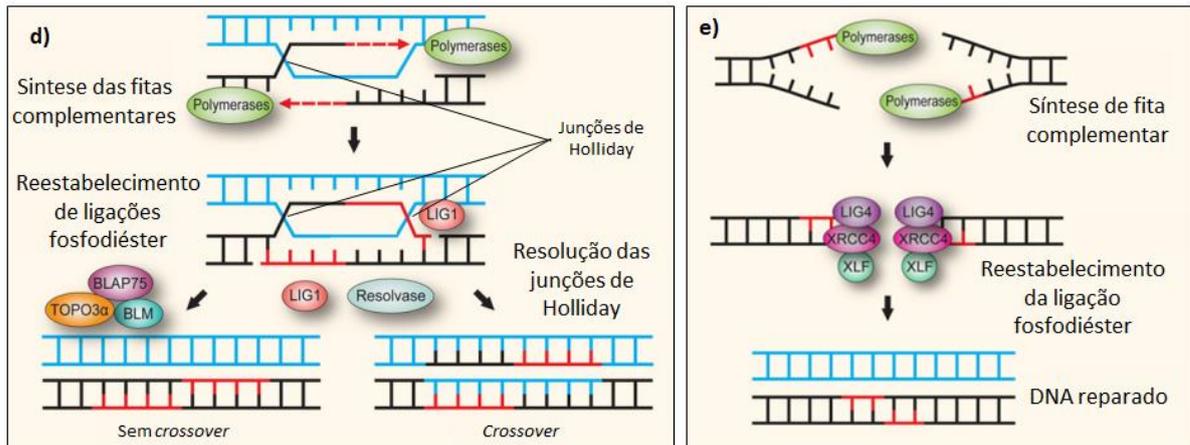


Figura 4: Esquemática das vias de reparo de quebras de duplas fitas. **a)** após formação da quebra, o complexo enzimático MRN é recrutado para o sítio de lesão e há a ativação de ATM através de sua fosforilação. O reparo pode seguir por duas subvias distintas: **b)** recombinação homóloga (HR), quando há a presença de cromossomo homólogo na forma de cromátide-irmã, ou **c)** junção de pontas não-homólogas (NHEJ), na ausência de fita homóloga. Em HR, um complexo enzimático irá promover a recessão da fita lesionada, deixando uma região de DNA simples fita em que se ligam monômeros de Rad51, protegendo esta região contra nucleases. Mais enzimas são recrutadas ao sítio de lesão (incluindo outras da família Rad), formando o complexo recombinase, que irá iniciar a busca por homologia, facilitada pela ação de Rad54, através da invasão da fita lesionada na dupla-hélice da cromátide-irmã, formando uma estrutura denominada *D-loop*. Após encontrada a região complementar, **d)** DNA polimerases sintetizam as fitas complementares, formando regiões de intersecção das fitas (junção de Holliday) que, quando resolvidas, irão resultar em duas moléculas de DNA híbrido (*crossover* entre DNA que sofreu lesão e DNA molde). Alternativamente, o reestabelecimento da ligação fosfodiéster por LIG1 e cooperação de outras enzimas podem gerar produtos sem *crossover*. Em NHEJ, o dímero Ku se liga nas pontas deixadas pela quebra e recruta a subunidade catalítica de DNA PK (DNA PKcs), que auxilia na aproximação das pontas. Em seguida, mais enzimas são recrutadas para promover a abertura da hélice e a recessão das pontas, por um mecanismo ainda não completamente elucidado. Finalmente, **e)** DNA polimerases inserem os nucleotídeos e as pontas são novamente conectadas através de um complexo enzimático, mediada pelo heterodímero XRCC4-Lig4. Adaptado de Jeppesen *et al.*, 2011.

1.1.4 Reparo de pareamentos errôneos (MMR)

A via de reparo de pareamentos errôneos (MMR, do inglês, *Mismatch Repair*) (**Figura 5**) é dedicada a erros de pareamento e pequenas alças de deleção/inserção que são incorporados pela maquinaria de replicação durante a replicação do DNA e recombinação gênica. Em eucariontes, a maquinaria enzimática de MMR está física- e funcionalmente associada à forquilha de replicação, possivelmente através de interações proteicas coordenadas pelo *sliding clamp* PCNA. O reconhecimento das lesões é realizado por um de dois heterodímeros, dependendo da natureza do pareamento errôneo. Após o reconhecimento, uma nuclease específica introduz uma quebra de fita simples próxima a lesão, resultando posteriormente em

ressecção exonucleolítica e ressíntese da fita de DNA de forma correta, que então é selada por uma DNA ligase, reestabelecendo a ligação fosfodiéster (revisado em Genschel e Modrich, 2003).

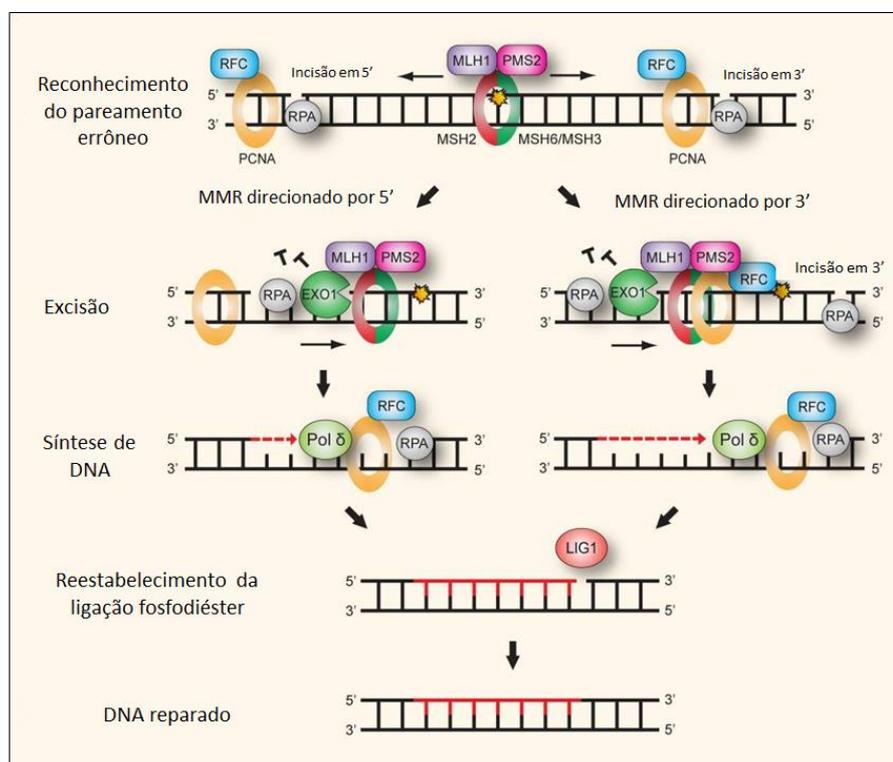


Figura 5: Esquemática geral da via de MMR em mamíferos. Após o reconhecimento do erro de pareamento por um dos heterodímeros (MSH2-MSH6 or MSH2-MSH3), o complexo MLH1-PMS2 é recrutado. Outro complexo contendo PCNA promove uma incisão no lado 5' ou 3' da lesão, o que irá direcionar os passos seguintes através de duas subvias mecanisticamente distintas, cuja maquinaria consiste basicamente do mesmo conjunto de enzimas, que irão promover a excisão dos nucleotídeos adjacentes à lesão até a região de incisão. Por fim, a fita de DNA complementar é sintetizada e a ligação fosfodiéster é reestabelecida. Adaptado de Jeppesen et al., 2011.

1.1.5 Patologias associadas à deficiência em reparo de DNA

Uma vez que o papel das atividades de reparo é garantir a integridade da estrutura e da sequência correta de nucleotídeos do DNA, a perda ou mau funcionamento de qualquer proteína envolvida nestes processos é potencialmente prejudicial para a célula. Alterações nas atividades enzimáticas de reparo têm sido cada vez mais associados a diversas patologias, mas principalmente câncer, envelhecimento precoce e neurodegeneração (Menck e Munford, 2014; Jeppesen et al, 2011). Com exceção das DNA glicosilases, que apresentam significativa sobreposição de substratos, a ausência de qualquer outra enzima de BER causa letalidade

embrionária (Friedberg e Meira, 2006), o que evidencia a importância desta via na viabilidade de um organismo. Além disso, são crescentes os estudos que mostram que a diminuição da atividade de BER está associada à neurodegeneração e envelhecimento (Sykora et al, 2015; Soltys et al, 2019). Mutações em genes que codificam proteínas da via NER causam doenças humanas autossomo-recessivas, como Xeroderma pigmentoso (XP) e síndrome de Cockayne (CS). Pacientes XP apresentam incidência muito elevada de câncer de pele, fotossensibilidade e neurodegeneração em alguns casos, enquanto pacientes CS apresentam fenótipo de progéria, neurodegeneração e expectativa de vida média de apenas 12 anos (Reid-Bayliss, 2016). Diversas síndromes resultantes da deficiência em vias de DSBR são caracterizadas por neuropatologias, algumas delas incluem neurodegeneração progressiva e, em alguns casos, microcefalia. Um exemplo deste tipo de síndrome é a doença autossômica recessiva rara ataxia telangiectasia, caracterizada pela perda do controle muscular durante movimentos voluntários (ataxia) e dilatação de vasos sanguíneos (telangiectasia). Mutações em genes de HR estão associados a cânceres de mama e ovário, o que recentemente ganhou destaque na mídia pelo “Efeito Angelina Jolie”, motivando uma reflexão sobre o papel da mídia no aconselhamento genético a portadores de tais mutações (Brianese et al, 2018; James et al, 2013; Vasconcellos-Silva et al, 2018). MMR reduz o número de erros associados à replicação do DNA. Por esse motivo, o mau funcionamento desta via aumenta significativamente a taxa de mutações espontâneas e, conseqüentemente, a incidência de tumores e cânceres tanto hereditários como esporádicos (Fishel et al 1993).

O número de evidências experimentais indicando uma relação causal entre o acúmulo de lesões no DNA e a falha na maquinaria de reparo com neurodegeneração é significativo. Particularmente, lesões oxidadas, isto é, causadas em decorrência de ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), compõem a parcela mais significativa de lesões no DNA de neurônios, já

que estas células consomem cerca de 20% do total do oxigênio consumido por um indivíduo adulto (Kety, 1957; Herculano-Houzel, 2011).

1.1.6 Lesões oxidadas ao DNA

O metabolismo natural da célula é fonte endógena de EROs, classe de moléculas resultantes da redução parcial do oxigênio molecular (O_2), capazes de reagir com biomoléculas, causando danos. As três espécies mais expressivamente detectadas em ambientes fisiológicos são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) sendo este último o mais reativo com o DNA (Balasubramanian et al, 1998; Evans, et al. 1997). Tais espécies são produzidas em grande quantidade por células específicas durante a resposta imunológica (revisado em Yang et al., 2013), mas em condições fisiológicas normais, uma das principais fontes de EROs é a cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, cujo potencial “vazamento” de elétrons resulta na constante liberação destas espécies no meio intracelular (**Figura 6**) (Dickinson, 2015).

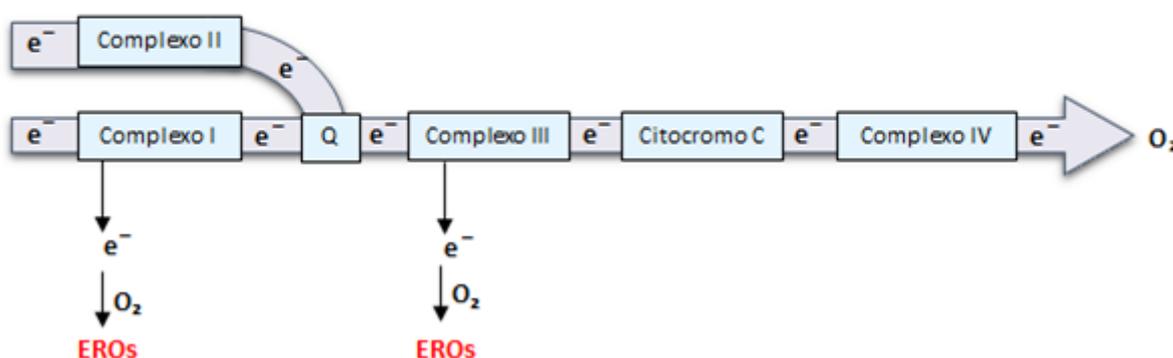


Figura 6: Esquematização da geração de EROs na matriz mitocondrial em decorrência do transporte de elétrons através da CTE. O fluxo normal de elétrons parte da oxidação de NADH ou succinato pelos complexos I e II, respectivamente. Estes elétrons são então transportados através de outras reações de oxido-redução ao longo dos complexos, até chegar no aceptor final, o O_2 , que é reduzido a H_2O . O vazamento de elétrons pode ocorrer nos complexos I e III, reduzindo O_2 monoelêtronicamente, gerando $O_2^{\cdot-}$. Adaptado de Dickinson, 2015.

Devido ao fato de a respiração celular ocorrer na mitocôndria, o DNA mitocondrial (mtDNA) é mais suscetível a oxidações, embora essas ocorram também no DNA nuclear. A exposição a altas tensões de oxigênio, como oxigênio atmosférico, também contribui para o estresse oxidativo (Chen et al, 2018), isto é, o desbalanço entre EROs e espécies antioxidantes. Portanto, células em ambientes com constante exposição ao ambiente externo, em teoria, estão mais suscetíveis a danos oxidados em seu DNA do que células que não experimentam esta exposição. Particularmente, as células responsáveis pela respiração e olfato estão constantemente expostas a alta concentração de O₂ atmosférica, e, portanto, são mais suscetíveis a estresse oxidativo (Perry et al, 2003; Ghanbari et al, 2004; revisado em Rogers e Cismowski, 2018 e Valavanidis et al, 2013).

1.2 As bases moleculares do olfato

Em vertebrados, o olfato se inicia (**Figura 7**) com o reconhecimento de moléculas voláteis denominadas odorantes através de receptores presentes em neurônios olfatórios sensoriais (do inglês, *Olfactory Sensory Neurons* – OSNs) localizados no epitélio olfatório (EO) da cavidade nasal. OSNs são neurônios bipolares com um único dendrito que alcança a superfície do epitélio, projetando cerca de 20 a 30 cílios bastante finos na mucosa nasal, e cujo axônio é projetado diretamente para o bulbo olfatório, no sistema nervoso central (SNC). Em um mesmo EO estão presentes milhões de OSNs, porém, cada um expressa um único tipo de receptor olfatório, específico para uma determinada classe de odorantes (revisado em Nagai et al., 2016). Diferentes OSNs que expressam o mesmo tipo de receptor não estão localizados, necessariamente, próximos uns dos outros, mas convergem seus axônios para uma mesma região denominada glomérulo, onde ocorre a sinapse destes neurônios com dendritos de neurônios do bulbo olfatório (BO). O sinal elétrico é então levado a diversas regiões do SNC, que culminarão com a percepção olfatória pelo indivíduo (revisado em Firestein, 2001).

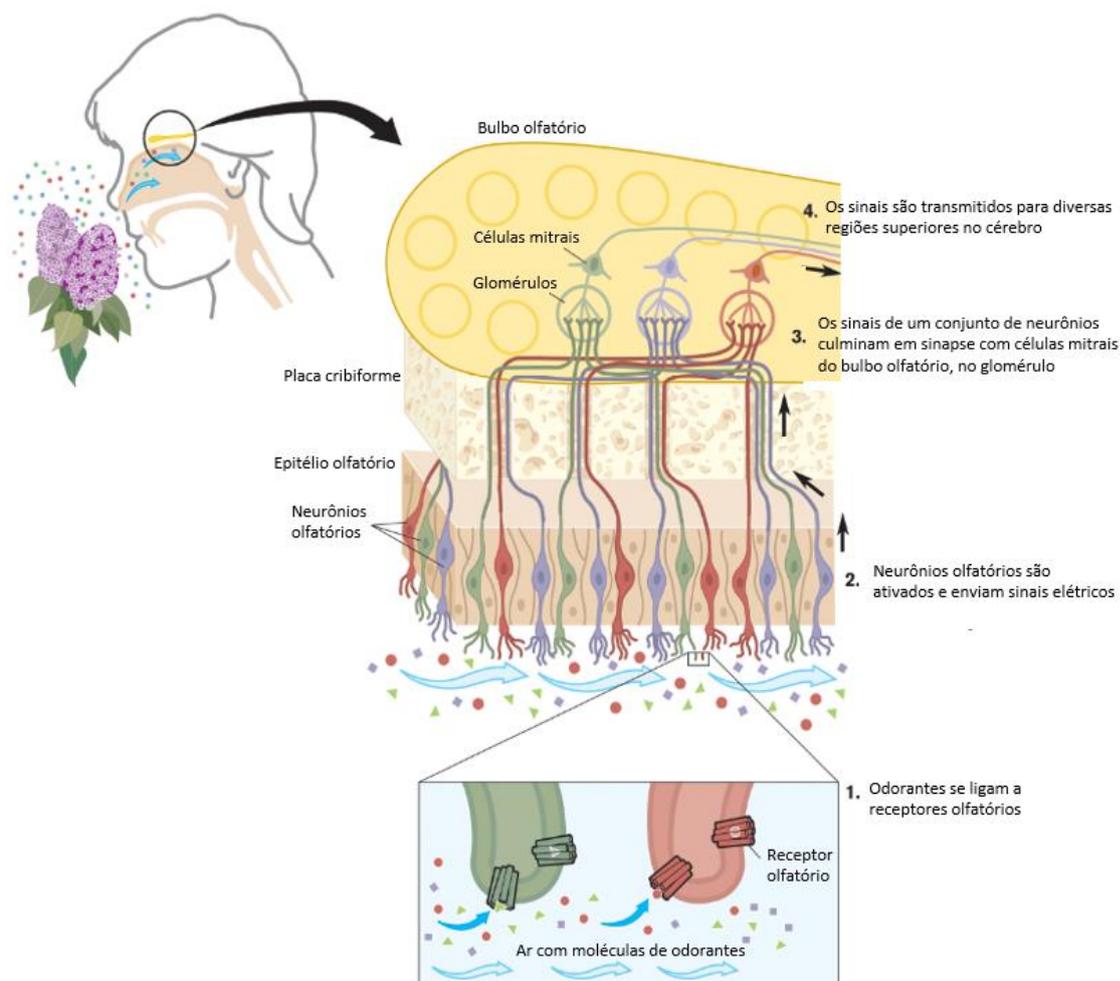


Figura 7: Esquema ilustrativo do sistema olfatório e da transmissão de sinal olfatório de mamíferos. (Adaptado de https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/odorant_high_eng.jpg)

O correto funcionamento das funções olfatórias é fator essencial em comportamentos animais, desde os mais instintivos como caça, proteção contra predadores, marcação territorial e encontro de um parceiro sexual desejável, até processos mais complexos de aprendizagem e memória. Além disso, devido à sua alta especificidade, o olfato tem um papel fundamental na percepção gustativa, e vice-versa. Isto porque a percepção gustativa é capaz de diferenciar apenas cinco tipos de sabores (doce, salgado, azedo, amargo e *umami*), enquanto a olfatória pode reconhecer diversas nuances entre um odorante e outro, aumentando a discriminação dos sinais.

1.2.1 Neurônios olfatórios são um tipo particular de neurônios

Neurônios olfatórios são uma classe particular de neurônios. Além de sua localização fora do contexto cerebral, esses neurônios estão necessariamente em contato com o ambiente externo e constantemente expostos a taxas mais altas de O₂ do que neurônios no sistema nervoso central (SNC). Além disso, para a maioria das regiões do SNC o processo de neurogênese é restrito ao período de desenvolvimento embrionário seguido de um curto período perinatal (Cone e Cone, 1976; revisado em Gage, 2002). A neurogênese consiste na divisão de células-tronco neurais e a subsequente maturação em células neurais progenitoras; estas progenitoras então migram e maturam em neurônios (Gage, 2019). Em adultos, a ocorrência deste processo é bastante limitada, restrita a duas regiões específicas. Em uma delas, neurônios na fase replicativa situam-se na zona subgranular (ZSG) parte do giro dentado do hipocampo, e migram, ao longo de sua maturação, para a região CA3, também no hipocampo (Altman e Das, 1965; Riksson et al., 1998; revisado em Schafer et al., 2016). Na segunda região, neurônios na fase replicativa estão na zona subventricular (ZSV) e migram, ao longo de sua maturação, para compor o tecido do bulbo olfatório (BO) que, portanto, é composto exclusivamente de células maduras (Doetsch et al., 1999; Lois e Alvarez-Buylla, 1994).

O EO também apresenta neurogênese adulta, tendo sua população de neurônios constantemente substituída ao longo da vida (revisado em Schwob et al., 2017; Brann e Firestein, 2014). Assim, a população de OSNs maduros possui tempo de vida mais curto do que outros tipos neuronais (Sultan-Styne *et al.*, 2009). Nesse contexto, acredita-se que a capacidade de regeneração do EO através de neurogênese é o que permite dar continuidade no funcionamento da função olfatória mesmo após um dano massivo, pois este tecido é capaz não só de repor os neurônios que foram perdidos, mas também de reestabelecer o fluxo sináptico para os glomérulos corretos após a lesão (Cheung et al. 2014). O processo de neurogênese contínua no EO é acompanhado de um fluxo de migração de OSNs ao longo de sua

diferenciação (**Figura 8**). No entanto, diferentemente do BO, que é composto exclusivamente de neurônios maduros, uma vez que a região de replicação está situada em uma região relativamente distante deste tecido (Lois e Alvarez-Buylla, 1994), a região de replicação, migração e localização de neurônios maduros no EO ocorre numa região muito próxima; portanto, a composição celular deste tecido inclui os três estágios de maturação neuronal (Schwob et al, 2018). Para sua função adequada, as células maduras necessitam estar em contato direto com o ambiente externo, por isso se localizam na região mais próxima ao lúmen da cavidade nasal, enquanto precursores de neurônios se localizam na região mais basal do EO.

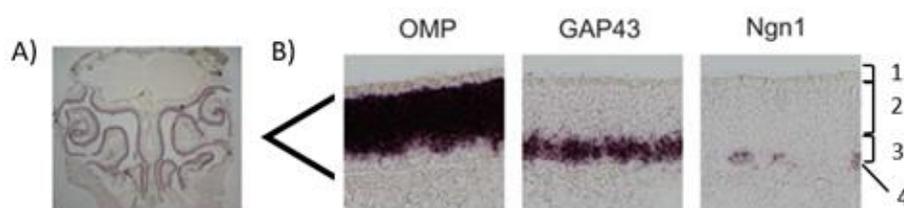


Figura 8: Organização celular do EO de camundongo. **A)** Corte frontal do crânio de camundongo. Em preto, OSNs marcados delimitam o interior do EO. **B)** Corte histológico do EO, em que **1)** camada de células de suporte; **2)** camada de OSNs maduros, identificados através do marcador OMP (*olfactory marker protein*); **3)** camada de OSNs imaturos, identificados através do marcador GAP43 e **4)** progenitores de neurônios, identificados através do marcador Ngn1. A cavidade nasal (lúmen) se localiza no topo da imagem. (Adaptado de Michaloski *et al.*, 2011).

1.2.2 Função olfatória, envelhecimento e neurodegeneração

A perda da função olfatória durante o envelhecimento normal e patológico tem sido extensivamente reportada (Bianchi *et al.*, 2013; Talamo *et al.*, 1989; Doty, 2012; Attems *et al.*, 2014; Conley *et al.*, 2016), porém, as bases moleculares e fisiológicas que causam e permeiam esta perda ainda não estão totalmente claras. Apesar disso, a perda olfatória é considerada um sintoma precoce de doenças neurodegenerativas, sendo um fator considerado para o diagnóstico e usado como marcador de resposta à tratamentos, em alguns casos (Kishikawa *et al.*, 1994, Velayudhan e Lovestone, 2009).

Há um consenso na literatura de que o envelhecimento é o principal fator de risco para neurodegeneração (Jorm *et al.*, 1987), embora ainda haja discussão acerca das bases

moleculares que determinam estes processos. Há também muitas evidências de que o acúmulo de danos ao DNA desempenha um papel causal em neurodegeneração (revisado em Jeppesen *et al.*, 2011, Madhabhuski *et al.*, 2014) e, portanto, as atividades de reparo de DNA estão intimamente relacionadas com tais patologias, como sugerem inclusive resultados recentes de nosso grupo, que mostram que as atividades de BER, diminuídas no cérebro *pós-mortem* de portadores da doença de Alzheimer, estão correlacionadas a um menor número de cópias de mtDNA, porém estes indivíduos não apresentam maior taxa de mutação no mtDNA (Soltys *et al.*, 2019). Assim, seria plausível especular que alterações em atividades de reparo de DNA em neurônios olfatórios contribuíssem para a perda olfatória observada durante o envelhecimento e em doenças neurodegenerativas, especialmente considerando a exposição constante a agentes potencialmente genotóxicos. No entanto, não existem informações disponíveis na literatura sobre atividades de reparo de DNA no contexto de neurônios no EO. Uma busca ampla em várias bases de dados de publicações científicas revelou apenas dois estudos que investigam o papel de enzimas de reparo na função olfatória e suas correlações, tanto no envelhecimento normal quanto patológico, e ambos apenas em BO (Misiak *et al.*, 2017; Canugovi *et al.*, 2015).

Uma vez que estes neurônios estão em contato constante com o ambiente externo contendo agentes genotóxicos, incluindo o O₂ atmosférico, especulamos que OSNs maduros teriam expressão aumentada de genes de reparo, e/ou acumulariam mais danos em seu genoma do que neurônios protegidos do contato direto com agentes genotóxicos do ambiente externo pelo crânio. Esta hipótese, caso confirmada, forneceria suporte para um melhor entendimento dos mecanismos que permeiam a perda olfatória observada no envelhecimento normal e patológico. A partir destas considerações, os objetivos deste trabalho foram propostos para estabelecer a fundamentação conceitual inicial para estudos futuros sobre as relações causais entre atividades de reparo de DNA e alterações funcionais em OSNs.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Identificar as vias de reparo de DNA presentes no EO de camundongos, ao nível de expressão gênica, e avaliar se há diferença nesta expressão ao longo da diferenciação celular de OSNs.

Identificar se o EO acumula mais lesões em DNA devido a sua exposição frequente a agentes genotóxicos.

1.1 Objetivos Específicos:

- a) Usando abordagens *in silico*, identificar a expressão de genes de vias canônicas de reparo de DNA em epitélio olfatório e analisá-los comparativamente quanto à idade de camundongos e ao estágio de diferenciação de OSNs;
- b) Caracterizar a expressão e localização de genes-chave das vias de reparo de DNA identificadas ao longo do EO de camundongos e analisá-los comparativamente quanto à idade;
- c) Quantificar os níveis de lesões em DNA nuclear e mitocondrial de tecido que passa por neurogênese (EO), tecido que não passa por neurogênese, mas é proveniente de linhagem replicativa (BO) e tecido que não passa por neurogênese e não é proveniente de linhagem replicativa (região arbitrária do córtex temporal), e analisa-los comparativamente.

3. METODOLOGIA

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Uso e Cuidado de Animais do Departamento de Bioquímica – IQ USP (#60/2017) e foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética Mitocondrial do Instituto de Química da USP, sob orientação da Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, e de Neurociência Molecular, sob co-orientação da Prof. Dra. Bettina Malnic.

3.1 Análise *in silico*: transcriptomas

Para as análises de expressão gênica de proteínas das vias de reparo de DNA, utilizamos dados obtidos a partir de análise de transcriptoma de EO camundongos selvagens recém-nascidos e com quatro semanas de idade, realizado previamente pelo nosso grupo através de sequenciamento de RNA (Camargo et al, 2019) e dados de transcriptoma de neurônios olfatórios maduros e seus precursores, separados por FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), realizado por Magklara e colaboradores (2011).

Para a avaliação da expressão basal de cada via, comparamos a expressão de quatro genes de cada via de reparo (**Tabela 1**), de maneira que houvesse pelo menos um gene envolvido em uma das etapas gerais de reconhecimento da lesão, remoção da lesão e processamento do DNA reparado.

Tabela 1 – Relação de genes analisados nos transcriptomas, respectivas proteínas codificadas e sua função.

	Gene	Proteína	Função na via
	UNG	UDG	Identificação e remoção de lesão (incorporação de uracila)
BER	POLB	POLB	Síntese de DNA após remoção da lesão
	OGG1	OGG1	Identificação e remoção de lesão (formação de 8-oxo-guanina); incisão na fita de DNA

	APEX1	APE1	Incisão na fita após a remoção da lesão
NER	XPC	XPC	Identificação de lesão (distorção de dupla-hélice em GG-NER)
	XPA	XPA	Identificação de lesão (distorção da dupla-hélice); ancoradouro para outras enzimas no sítio da lesão
	ERCC6	CSB	Ancoradouro para outras enzimas após a parada da RNA polimerase II em TC-NER
	POLD1	POLD1*	Síntese de DNA após remoção da lesão
HR	BRCA1	BRCA1	Identificação e marcação da lesão (ubiquitinação)
	BRCA2	BRCA2	Ancoradouro para o complexo recombinase** (interação com filamentos de Rad51)
	RAD52	RAD52	Componente do complexo recombinase**
	EXO1	EXO1	Recessão 5' → 3' da fita de DNA após lesão
NHEJ	XRCC6	Ku70	Proteção das pontas de DNA (ligação na dupla-hélice) em conjunto com Ku80
	XRCC5	Ku80	Proteção das pontas de DNA (ligação na dupla-hélice) em conjunto com Ku70
	PRKDC	DNA-PKcs*	Formação do complexo DNA-PKcs (aproximação das pontas de DNA)
	LIG4	LIG4	Ligação de DNA após remoção da lesão

*Subunidades catalíticas

**O complexo recombinase prepara a busca por homologia

3.2 Medida do padrão de expressão gênica das vias de reparo de DNA

O padrão de expressão de genes codificadores das proteínas de reparo escolhidas foi medido em camundongos da linhagem C57BL/6J em duas diferentes idades: recém-nascidos (neonatos) e com três semanas de idade. Para o grupo neonatos, consideramos o intervalo de 4 a 7 dias de idade.

3.2.1 Obtenção das amostras

Os animais foram mantidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química, na Universidade de São Paulo, de acordo com protocolos estabelecidos pela unidade, desde o nascimento até o momento de eutanásia, sem qualquer tipo de intervenção ou tratamento. Os protocolos de manutenção dos animais estão descritos em “Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório”, e estão disponíveis em <<http://interactivepdf.uniflip.com/2/81637/296210/pub/index.html>>. Todos os neonatos foram mantidos junto à mãe e retirados até no máximo 1h antes de serem eutanasiados. Todos os utensílios utilizados na dissecação foram esterilizados antes do procedimento e tratados com inibidor de RNAses, quando necessário.

Camundongos jovens foram eutanasiados em câmara de CO₂ seguido de decapitação, enquanto neonatos foram eutanasiados por hipotermia em uma câmara contendo gelo seco (sem contato físico), o que proporciona leve sedação, seguida de decapitação. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do IQ-USP, e seguem os protocolos estabelecidos no Biotério, conforme descrito no “Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório”.

Todos os animais foram dissecados com o auxílio de uma lupa (especialmente neonatos) para a retirada do EO inteiro (**Figura 9**). Após a retirada do tecido, esse foi imediatamente mantido em gelo seco e armazenado em freezer -80°C até o processamento.

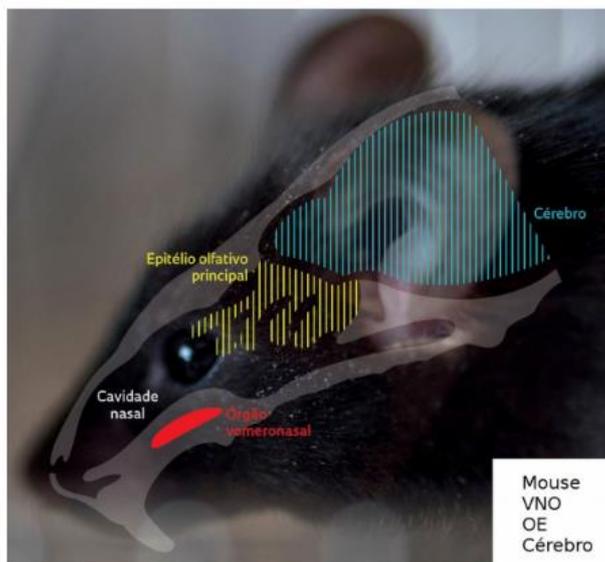


Figura 9: Representação da localização do EO de camundongos.

3.2.2 Preparação das amostras

Utilizamos a linhagem celular C2C12, um subclone da linhagem celular de mioblastos de camundongos da linhagem C2 (ATCC® CRL-1772™), para a padronização de todos os primers utilizados (**Apêndice A**). A extração de RNA foi feita com o *kit GenElute* (Sigma-Aldrich), de acordo com as especificações do fabricante, sendo adicionada uma etapa de digestão com DNase I (Thermo Scientific), para a eliminação de contaminação por DNA. A concentração de RNA nas amostras foi quantificada através da medida da absorbância em 260 nm no equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). A verificação da pureza das amostras foi feita no mesmo equipamento, através da razão entre os valores de Absorbância 260/230 (a absorbância em 230 nm corresponde à contaminação por moléculas orgânicas) e 260/280 (a absorbância em 280 nm corresponde à contaminação por proteínas). Apenas as amostras cujas razões ≤ 2 foram utilizadas.

Amostras que apresentaram contaminação por moléculas orgânicas foram tratadas com solução de etanol 75% RNase-free e acetato de amônio 2 M para precipitação de RNA, incubadas em gelo por 1h e centrifugadas por 12.000 g durante 30 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, os *pellets*, suspensos no dobro de volume de etanol 75%

RNAse-free adicionado inicialmente e os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Após a segunda centrifugação, os tubos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente (15-25°C) para dissolver sais co-precipitados. Em seguida, os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e descartados. Os precipitados foram novamente suspensos no dobro de volume de etanol RNAse-free, centrifugados e incubados à temperatura ambiente. Após a retirada do segundo sobrenadante após incubação, os tubos foram deixados para secar durante 10 minutos a temperatura ambiente sobre uma bancada isolada e devidamente sinalizada, para evitar contaminação com RNAses. Finalmente, os precipitados foram suspensos em água tratada com DEPC previamente preparada e novamente quantificados e verificados quanto à sua pureza.

A integridade das amostras foi verificada pela presença de bandas típicas correspondentes às subunidades 16S e 18S de RNA ribossomal, através da resolução de alíquotas de 1 µg de cada amostra em gel de agarose 1% (m/V) em tampão TAE (Tris base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético para pH 8,0), seguido de incubação do gel em solução de brometo de etídeo (2 µg/mL) e analisado em equipamento transiluminador UV (Thermo Scientific).

3.2.3 Reações de transcrição reversa e análise quantitativa de cDNA

Para obter o DNA complementar de fita simples utilizamos o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Scientific), conforme especificações do fabricante. As reações foram realizadas em volumes de 25 µL, utilizando até 2 µg de RNA total.

A análise de expressão do mRNA de todos os genes de interesse foi realizada através de PCR quantitativo em tempo real. Para isto, preparamos reações de 20 µL utilizando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific) e realizamos as amplificações no equipamento *7300 Real Time PCR System* (Thermo Scientific), ambas seguindo especificações do fabricante. Como controle endógeno da quantificação relativa, utilizamos o gene HMBS. As

sequências dos *primers* (**Tabela 2**) foram obtidas utilizando o banco de dados *PimerBank de Harvard* (Wang, 2002), validados por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabela 2 – Relação de primers utilizados na quantificação de expressão gênica via PCR quantitativo em tempo real – RT-PCR.

	Gene	Sequência direta 5' → 3'	Sequência reversa 3' → 5'
Via BER	UNG	TTCGGGAAGCCGTA CTTCG	CATCTGGGTCCATGTGAACAC
	POLB	TGAACCATCATCAACGAATTGGG	CCATGTCTCCACTCGACTCTG
	OGG1	CTGCCTAGCAGCATGAGACAT	CAGTGTCCATACTTGATCTGCC
	APEX1	ACGGGGAAGAACCCAAGTC	TCCACATTCCAGGAGCATATCT
Via HR	Rad 52	CTTTGTTGGTGGGAAGTCTGT	CGGCTGCTAATGTACTCTGGAC
	Exo1	TGGCTGTGGATACCTACTGTT	ATCGGCTTGACCCCATAAGAC
	BRCA1	CGAATCTGAGTCCCCTAAAGAGC	AAGCAACTTGACCTTGGGGTA
	BRCA2	ATGCCCGTTGAATACAAAAGGA	ACCGTGGGGCTTATACTCAGA
Via NER	XPC	TCCAGGGGACCCACAAAT	GCTTTTTGGGTGTTTCTTTGCC
	XPA	CCCAAAATGATTGACACCAAAGG	TGGTTCATAAGGTACGAGTCCA
	ERCC6	GAGACCACAGAGAAACGTCCA	CTCCTGCTCACTGGTTTGTCT
	POLD1	TCGCAGTTTGAGGCGAACC	CTGAGCCACATAGTGGTCA
Via NHEJ	XRCC6	ATGTCAGAGTGGGAGTCCTAC	TCGCTGCTTATGATCTTACTGGT
	XRCC5	ATGGCGTGGTCCGGTAATAAG	CCTGTCGTTGGACAAACATAGTC
	PRKDC	AAACCTGTTCCGAGCTTTTCTG	TAAGGGCACAGCATATCGCTT
	LIG4	TTTGCAGACTTATGTTCCACACT	TCCTTTCTGTTCTTATGAAGGGC
Normalizador	HMBS	AAGGGCTTTTCTGAGGCACC	AGTTGCCCATCTTTCATCACTG
Marcadores olfatórios	Ric-8B	AGCTGGTTCGTCTCATGACAC	CAGCGTTCATAGCCAGTG
	Ngn1	CCAGCGACACTGAGTCCTG	CGGGCCATAGGTGAAGTCTT
	OMP	TCCGTCTACCGCCTCGATTT	CGTCTGCCTCATTCCAATCCA

Todos os *primers* foram previamente submetidos à validação (**Apêndice A**) através da determinação da eficiência e especificidade de amplificação a partir de amostra de cDNA da linhagem C2C12. Realizamos reações de amplificação em diluições seriadas contendo 0,72; 3,6; 18 e 90 ng de cDNA, em triplicata, utilizando os mesmos equipamentos e reagentes descritos no item 3.2.3. O cálculo de eficiência de amplificação foi obtido baseado na inclinação (*slope*) da curva padrão. A faixa de eficiência aceita foi entre 0,80 – 1,2 (fator de amplificação entre 1,8 e 2,2) e o valor de $R^2 \geq 0,97$. A medida de quantificação relativa (QR) seguiu a equação proposta por Pfaffl (Pfaffl, 2001) com adaptações, a partir dos valores de fatores de amplificação dos genes de interesse e de referência (FA_{INT} , FA_{HKG} , respectivamente), obtidos através da eficiência de cada par de primers e dos valores de Δct das amostras de neonatos e com três semanas de idade (ΔCT_{nwb} e ΔCT_{3wo} , respectivamente), como segue:

$$QR = \frac{FA_{HKG}^{\Delta ct_{nwb} - \Delta ct_{3wo}}}{FA_{INT}^{\Delta ct_{nwb} - \Delta ct_{3wo}}}$$

3.3 Localização espacial das proteínas de reparo em cortes histológicos de EO

3.3.1 Preparação de lâminas

Amostras de epitélio olfatório inteiro foram obtidos de três camundongos com três semanas de idade (eutanasiados como descrito em **3.2.1**), utilizando utensílios previamente limpos com solução de inibidor de RNase. Os órgãos foram imediatamente colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% e deixados em geladeira *overnight*. No dia seguinte, os órgãos foram transferidos para uma solução livre de RNases de 0,45 M de EDTA em PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 2.7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4) e incubados também *overnight*. Em seguida, foram transferidos para uma solução contendo 20% (m/v) sacarose em PBS por meia hora, retirados, cuidadosamente secos utilizando *kimwipes*, transferidos para

moldes plásticos contendo meio de montagem (*Tissue Tek*) para crioproteção e congelados em gelo seco antes de serem armazenados em -80°C.

3.3.2 Síntese de ribossondas

As sequências dos genes de interesse foram obtidas do *GeneBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e utilizadas para o desenho de *primers* para a amplificação de fragmentos, a que chamamos de inserto, de 800-1000 pb da sequência codificadora dos mRNAs, utilizando o software GENtle (<http://gentle.magnusmanske.de/>). A relação de sequências de *primers* e tamanho dos insertos está apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Relação de *primers* e tamanho de insertos utilizados na síntese de sondas para hibridização *in situ*.

Descrição	Tamanho do amplicon (bp)	Sequência
<i>APE1 forward</i>	995	ACGGGGAAGAACCCAAGTC
<i>APE1 reverse</i>		AACACCTGAAGGCTAAAACACCAG
<i>POLB forward</i>	836	AACTCGCAAACCTTTGAGAAGAACGTG
<i>POLB reverse</i>		GCGGATGGTGTACTCATTGATTGTG
<i>XRCC5 forward</i>	945	TTCCTGGACGCCCTGATTGTG
<i>XRCC5 reverse</i>		ATAAACTAAACACTCATAGGCGTC
<i>XRCC6 forward</i>	803	TGACTACTCTTTGAGTGAAGTGCTC
<i>XRCC6 reverse</i>		AGACGTTCTTCCGGGGTGTG

Os insertos foram clonados em vetor *pGEM-T Easy* (Promega) e suas sequências foram confirmadas através de análise de restrição e sequenciamento. Os plasmídeos contendo as sequências corretas foram linearizados por restrição com enzimas de modo que a sequência complementar ao mRNA (cRNA) esteja contígua ao promotor de RNA Polimerases virais (SP6 ou T7). Utilizamos estes plasmídeos como molde para a síntese *in vitro* de ribossondas com polimerases virais SP6 RNA Polimerase ou T7 RNA Polimerase, utilizando uracilas marcadas com Digoxigenina.

3.3.3 Hibridização *in situ*

Utilizamos o protocolo de hibridização proposto por (Nakahara, 2014), baseado no trabalho de (Ishii et al., 2004), composto por três etapas, como descrito:

Etapa 1 - Pré-Tratamento das seções e hibridação:

As lâminas foram secas utilizando secador por 10 min, e em seguida fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Então foram lavadas e tratadas com HCl 0,1 M por 10 min para permeabilização e tratadas por 30 min com H₂O₂ 0,1% (v/v) a fim de inativar peroxidases endógenas. Em seguida, as amostras foram acetiladas com 1 mL de Anidrido Acético em 250 mL de trietanolamina 0,1 M pH 8,0, e hibridadas com solução de hibridação pré-aquecida (50% (v/v) Formamida, 10% (m/v) Sulfato de Dextran, NaCl 600 mM, RNA-transportador de levedura 200µg/ml, 0,25% (m/v) SDS, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 1X Solução de Denhardt, EDTA 1mM) contendo sondas antissenso de RNA nas concentrações especificadas, durante um período de 16 h a 60°C, cobertas com lamínulas de vidro.

Etapa 2 - Lavagem e incubação com anticorpo:

No segundo dia, as lamínulas foram deslocadas em 5X SSC (750 mM NaCl, 75 mM citrato de sódio, pH 7.0) e as lâminas foram lavadas a 60°C em 2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM citrato de sódio, pH 7.0) por 30 min, 0,2X SSC (30 mM NaCl, 3 mM citrato de sódio, pH 7.0) por 20 min e 0,1X SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM citrato de sódio, pH 7.0) por 20 min. Foram

então transferidas para solução 0,1X SSC à temperatura ambiente, e em seguida para: i) uma solução de PBS com 0,1% (v/v) Tween-20 por 10 minutos; ii) tampão TN (Tris- HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) por 5min duas vezes. Essas lâminas foram, então, bloqueadas em tampão TNB (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% Reagente de Bloqueio (Perkin Elmer)). As lâminas foram então incubadas com anticorpo anti-DIG-AP (ROCHE), diluído em 1:800 em 200µL de tampão TNB (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% (m/v) reagente de bloqueio PerkinElmer FP1020), cobertas com lamínula de Parafilm™, a 4°C *overnight*.

Etapa 3 - Marcação Cromogênica Simples:

As lâminas foram lavadas 6 vezes em tampão TNT (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% Tween-20) por 5min cada, com agitação suave. Em seguida, lavadas duas vezes em tampão da Fosfatase Alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, 0,1% Tween-20) por 5min. Então foram incubadas com uma solução 1:1 (V/V) de Tampão da Fosfatase Alcalina 2X : 10% (v/v) Álcool Polivinílico (Mowiol). O Tampão da Fosfatase Alcalina 2X foi filtrado e após a adição de 10% PVA, foram adicionados 6,7 ul de NBT 75 mg/mL e 5 ul de BCIP 50 mg/mL.

3.4 Medida do número de lesões em DNA

3.4.1 PCR de longa extensão

Amostras de três regiões neuronais distintas: EO, BO e uma região neuronal não-olfatória do córtex (CT), foram extraídas de três camundongos (eutanasiados como descrito em **item 3.2.1**) com três semanas de idade, conforme ilustrado na **Figura 10**. O DNA total destas regiões foi extraído utilizando o *kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen). As amostras foram quantificadas no equipamento NanoDrop (ThermoFisher Scientific) e diluídas a uma concentração de 6 ng/uL para serem utilizadas nas reações de amplificação, segundo protocolo adaptado de Kovalenko e Santos (2009). A quantidade de DNA molde utilizada em cada reação

foi padronizada previamente. Para a amplificação dos fragmentos longos, utilizamos o *kit AccuPrime Tak DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e, para os fragmentos curtos, o *kit Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen). As condições experimentais de cada reação estão resumidas na **Tabela 4** e a relação de sequências de *primers* utilizados, bem como o tamanho de produtos de amplificação estão apresentados na **Tabela 4**. As sequências dos *primers* foram obtidas por Kovalenko e Santos (2009).

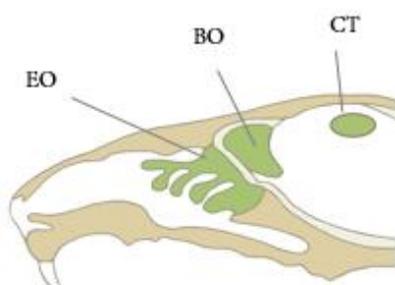


Figura 10: Esquematização ilustrativa das regiões neuronais (EO, BO e CT) utilizadas nas reações de PCR de longa extensão.

Tabela 4 – Condições experimentais utilizadas nas reações de amplificação de fragmentos para o ensaio de PCR de longa extensão.

Fragmento	DNA (ng)	Programa no termociclador
Fragmento curto nuclear	120	94°C por 3 minutos (1 ciclo)
		94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (22 ciclos)
Fragmento longo nuclear	30	94°C por 30 segundos (1 ciclo)
		94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 68°C por 15 minutos (33 ciclos)
Fragmento curto mitocondrial	3	94°C por 3 minutos (1 ciclo)
		94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (22 ciclos)
Fragmento longo mitocondrial	6	94°C por 30 segundos (1 ciclo)
		94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 68°C por 18 minutos (28 ciclos)

Tabela 5 – Relação de *primers* utilizados no ensaio de PCR de longa extensão

Descrição	Tamanho do amplicon (bp)	Sequência
Fragmento longo mitocondrial <i>forward</i>	10.000	GCCAGCCTGACCCATAGCCATAATAT
Fragmento longo mitocondrial <i>reverse</i>		GAGAGATTTTATGGGTGTAATGCGG
Fragmento curto mitocondrial (RNR1) <i>forward</i>	128	AACCTCCATAGACCGGTGTAAAA
Fragmento curto mitocondrial (RNR1) <i>reverse</i>		TTTATCACTGCTGAGTCCCGT
Fragmento longo nuclear (β - globina) <i>forward</i>	8.700	TTGAGACTGTGATTGGCAATGCCT
Fragmento longo nuclear (β - globina) <i>reverse</i>		GCCTGGACTTTGCCCTAAT
Fragmento curto nuclear (HPRT) <i>forward</i>	134	GCCTGGACTTTGCCCTAAT
Fragmento curto nuclear (HPRT) <i>reverse</i>		CGCCTTTCCACTCTTCAGGT

Após as reações, os produtos de amplificação de fragmentos longos foram resolvidos em gel de agarose 1% , em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.0), e de fragmentos curtos em gel de poliacrilamida (19:1, acrilamida:bis-acrilamida) 10%, em tampão TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram corados em brometo de etídio, fotografados sob luz UV e a quantificação da intensidade das bandas foi feita utilizando o *software* ImageJ vl.48. Para cada amostra, foram realizados pelo menos dois experimentos independentes.

A frequência de lesões foi calculada baseado no protocolo de Kovalenko e Santos, com algumas adaptações. Normalizamos a amplificação dos fragmentos longos pela amplificação dos fragmentos curtos em cada grupo (EO, BO e CT). Em seguida, normalizamos a amplificação corrigida dos grupos EO e BO (A_{EO} e A_{BO} , respectivamente) pela amplificação corrigida de CT (A_{CT}), resultando em uma amplificação relativa dos dois primeiros grupos. Assumindo uma distribuição aleatória de lesões e usando a equação de Poisson [$f(x)=e^{-\lambda}\lambda^x/x!$, em que λ é a frequência média de lesão] para *templates* sem lesão (isto é, $x = 0$), a frequência média de lesão por fita de DNA é determinada por $\lambda = -\ln A_{EO,BO}/A_{CT}$.

3.5 Análises estatísticas

Dados retirados de transcriptomas disponíveis na literatura são apresentados na forma de tabelas. Dados obtidos experimentalmente estão representados graficamente como média \pm desvio padrão, exceto quando indicado. Comparações entre as médias dos grupos experimentais foram feitas através do teste *t* de Student's para amostras não pareadas com o software GraphPad Prism v5.01. Estabelecemos o valor de $p < 0,05$ como médias significativamente diferentes.

4. RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* de genes de reparo de DNA em EO de camundongos

Escolhemos analisar quatro das principais vias de reparo por excisão: BER, NER, HR e NHEJ, que são responsáveis pelo reparo das principais lesões induzidas em DNA por genotoxinas endógenas e exógenas, como radiações UV e ionizantes, agentes oxidantes, alquilantes e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Para cada via, analisamos quatro genes (**Tabela 1, item 3.1**), escolhidos de maneira que houvesse ao menos um gene envolvido em cada um dos três passos gerais de reparo: reconhecimento da lesão, remoção da lesão e processamento da(s) fita(s) de DNA excisada(s).

Uma vez que OSNs, diferentemente da maioria dos neurônios do sistema nervoso central (SNC), passam por neurogênese e maturação ao longo do tempo, optamos por bases de dados cujas informações refletissem estes processos. Analisamos, portanto, dados de transcriptoma obtido através de sequenciamento de RNA de EO de camundongos selvagens, da linhagem C57BL/6J, recém-nascidos e com quatro semanas de idade, realizados pelo nosso grupo (Camargo et al, 2019), para que pudéssemos ter uma visão geral dos processos ao longo do desenvolvimento. Analisamos também dados de transcriptoma de OSNs murinos da linhagem C57BL/6J maduros e seus precursores, separados por FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), realizado por (Magklara et al, 2011), também através de sequenciamento de RNA, para que pudéssemos avaliar mais especificamente as alterações nas atividades de reparo de DNA durante o processo de diferenciação de OSNs. Os resultados obtidos estão sumarizados nas **Tabelas 6 e 7**. As medidas são normalizadas por fragmentos por kilobase de éxons por milhão de fragmentos mapeados (FPKM). Os transcritos estão identificados segundo o nome do respectivo gene.

Tabela 6: Valores de FPKM dos genes representativos de cada via de reparo em camundongos neonatos e com 4 semanas de idade.

	Gene	FPKM			Gene	FPKM	
		Neonatos	4 semanas			Neonatos	4 semanas
BER	UNG	10,9	1,5	NER	XPC	4,2	4,7
	POLB	11,9	14,5		XPA	9,3	13,0
	OGG1	7,3	8,9		ERCC6	3,1	4,4
	APEX1	11,2	5,6		POLD1	13,5	6,5
HR	BRCA1	9,5	2,8	NHEJ	XRCC6	11,7	15,2
	BRCA2	1,7	1,0		XRCC5	11,7	11,5
	RAD52	7,3	10,1		PRKDC	7,1	8,4
	EXO1	2,1	0,6		LIG4	3,1	5,7

A análise global da expressão de genes de reparo de DNA com relação à idade do camundongo sugere, de maneira geral, que a expressão dos genes das vias de BER, NER e HR ou não varia com a idade ou diminui; por outro lado, a expressão dos genes da via NHEJ tende a aumentar levemente durante o desenvolvimento. Da via BER, os genes POLB e OGG1 parecem não mudar significativamente seu padrão de transcrição, enquanto a expressão de APEX1 diminui pela metade e de UNG diminui cerca de dez vezes nos camundongos mais velhos. Este mesmo padrão foi observado para os genes da via de HR: EXO1, BRCA1 e BRCA2 diminuem drasticamente o nível de expressão, enquanto apenas RAD52 tem seus níveis de transcrição aumentados, nos animais mais velhos. Os genes da via de NER investigados aqui apresentam respostas distintas durante o desenvolvimento, uma vez que os genes XPC e CSB

não diferem quanto aos níveis de transcrição, enquanto XPA tem um leve aumento. Mesmo assim, o decréscimo na transcrição de POLD1 é muito mais proeminente do que dos outros genes. Os genes da via de NHEJ não apresentaram alterações grandes de expressão em camundongos mais velhos, com exceção do gene LIG4 que apresentou níveis de transcrição duas vezes maior em adultos.

Tabela 7: Valores de FPKM dos genes representativos de cada via de reparo em precursores de OSNs (Ngn1+) e OSNs maduros (OMP+).

	Gene	FPKM			Gene	FPKM	
		Ngn1+	OMP+			Ngn1	OMP+
BER	UNG	2,0	0,1	NER	XPC	13,5	12,3
	POLB	29,7	32,4		XPA	15,2	12,8
	OGG1	6,3	6,8		ERCC6	3,2	3,4
	APEX1	32,6	9,1		POLD1	16,7	4,5
HR	BRCA1	2,9	0,8	NHEJ	XRCC6	12,0	37,9
	BRCA2	1,0	0,4		XRCC5	8,0	8,4
	RAD52	5,1	2,2		PRKDC	5,5	2,9
	EXO1	0,6	0,0		LIG4	1,6	2,5

Os resultados obtidos quando comparamos a expressão dos transcritos durante a maturação dos OSNs (Tabela 7) recapitula as variações observadas com relação à idade dos camundongos, sendo as diferenças, no entanto, mais acentuadas. Esta observação, provavelmente, resulta do fato de que camundongos recém-nascidos têm maior proporção de precursores de neurônios em seu EO, e camundongos adultos terão maior proporção de

neurônios maduros. É interessante notar, no entanto, que embora alguns genes tenham apresentado padrão de transcrição inverso ao observado anteriormente, como RAD52 e PRKDC, a maioria manteve a variação observada na comparação entre neonatos e animais adultos, especialmente aqueles cuja diferença é grande, como UNG, BRCA1, XRCC6 e POLD1. Considerando que os dois conjuntos de dados utilizados aqui foram obtidos em laboratórios diferentes, e utilizando amostras diferentes (tecido total *vs* populações enriquecidas), a alta concordância entre os resultados sugere que, de fato, essas variações devem estar refletindo alterações biológicas relevantes. É também importante ressaltar que embora a técnica de sequenciamento de RNA forneça uma boa visão qualitativa, ela carece de validações mais específicas do ponto de vista quantitativo de genes transcritos.

4.2 Análise da expressão de genes de reparo por PCR em tempo real

4.2.1 Amostras utilizadas na padronização dos primers

Dada a limitada disponibilidade das amostras teste, para a validação dos resultados obtidos nas análises *in silico* inicialmente tentamos realizar a padronização dos *primers* com amostras de tecido neuronal obtido de camundongos que seriam descartados. Estes animais não passaram por nenhum tipo de intervenção, e foram mantidos nas mesmas condições daqueles utilizados neste projeto. No entanto, o RNA obtido das amostras se apresentou, consistentemente, contaminado, o que persistiu mesmo após modificações nas quantidades de material inicial e adaptações no protocolo sugerido pelo fabricante. Além disso, o rendimento não foi satisfatório para a realização da padronização dos 16 pares de *primers* utilizados. As amostras que foram submetidas a precipitação com etanol tiveram ainda menor rendimento, apesar de não apresentarem mais absorvância significativa em 230 nm. Sendo assim, a linhagem de mioblastos murinos C2C12 foi escolhida por apresentar boa concentração e qualidade dos RNAs obtidos (**Apêndice A**).

4.2.2 Marcadores olfatórios

Uma vez que utilizamos todo o tecido do epitélio olfatório ao invés de populações enriquecidas em precursores e neurônios olfatórios maduros, consideramos importante confirmar que as idades escolhidas (neonatos *vs* animais jovens com 3 semanas de idade) refletiam adequadamente a mudança no perfil das população de células maduras/imaturas que compõem o EO dos animais. Sendo assim, escolhemos três marcadores de diferenciação de OSNs, que deveriam indicar uma maior população de precursores de neurônios em camundongos neonatos e maior população de células maduras em camundongos jovens. As proteínas OMP (*olfactory protein marker*, modulador da cascata de transdução de sinal olfatório) e Ngn1 (neurogenina 1, fator de transcrição envolvido na iniciação da diferenciação neuronal) são marcadores específicos de maturidade de OSNs, de forma que é esperado que OMP seja consideravelmente mais expresso em células maduras e Ngn1, em precursores (Nickell, 2012). A proteína Ric-8b é uma GEF (fator de troca de nucleotídeo guanina) que está associado a subunidade da proteína G de receptores olfatórios, e é mais expressa em neurônios maduros do que em seus precursores (Machado *et al*, 2017). Os resultados obtidos da análise da expressão desses genes nas amostras de tecido olfatório utilizadas nesse estudo estão apresentados na **Figura 11** em termos de expressão relativa às amostras de neonatos, consideradas, para questões de cálculo, como controle, e confirmam que as amostras de EO de camundongos com 3 semanas de idade apresentam uma maior população de OSNs maduros. Assim, essas amostras foram utilizadas para os experimentos subsequentes.

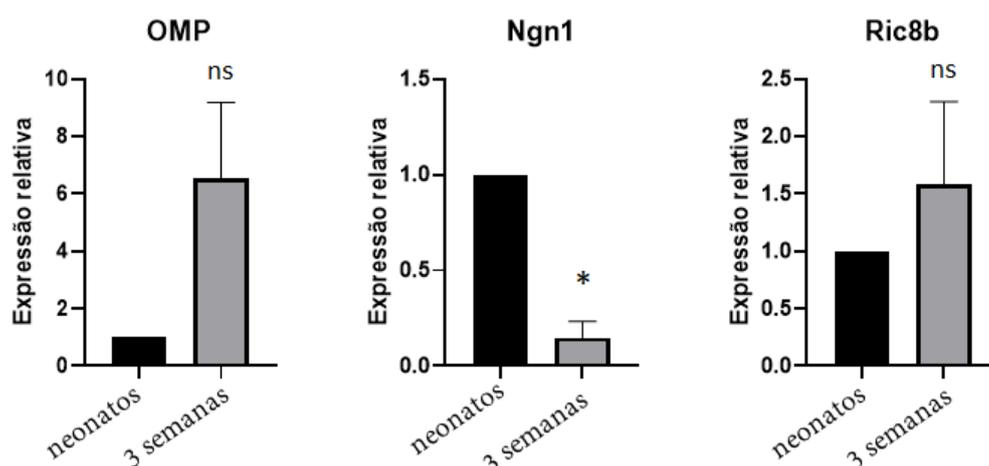


Figura 11: Análise por PCR em tempo real de expressão de mRNA de genes marcadores indiretos (Ric-8b) e diretos (OMP, Ngn1) de maturidade olfatória, a partir de cDNA de EO de camundongos neonatos (nwb), e com três semanas de idade (3wo); utilizando HMBS como normalizador endógeno. Os resultados são expressos como a média + desvio padrão de três réplicas biológicas, em triplicatas, de dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$, ns não significativo).

4.2.3 Validação das análises *in silico* para a expressão de genes de reparo

Para validar os resultados obtidos com a análise dos transcriptomas, utilizamos a técnica de quantificação relativa de expressão por PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para cada gene, após verificação da eficiência de amplificação de cada par (**Apêndice A**).

As **Figuras 12-15** apresentam os resultados obtidos na quantificação de dois experimentos de PCR em tempo real, a partir de três réplicas biológicas de EO de camundongos neonatos e com 3 semanas de idade, realizadas em triplicata. Os resultados são apresentados como expressão relativa às amostras de neonatos, consideradas, para questões de cálculo, como controle. Como pode ser observado, há diminuição significativa na expressão da maioria dos genes investigados em camundongos jovens, comparados aos neonatos.

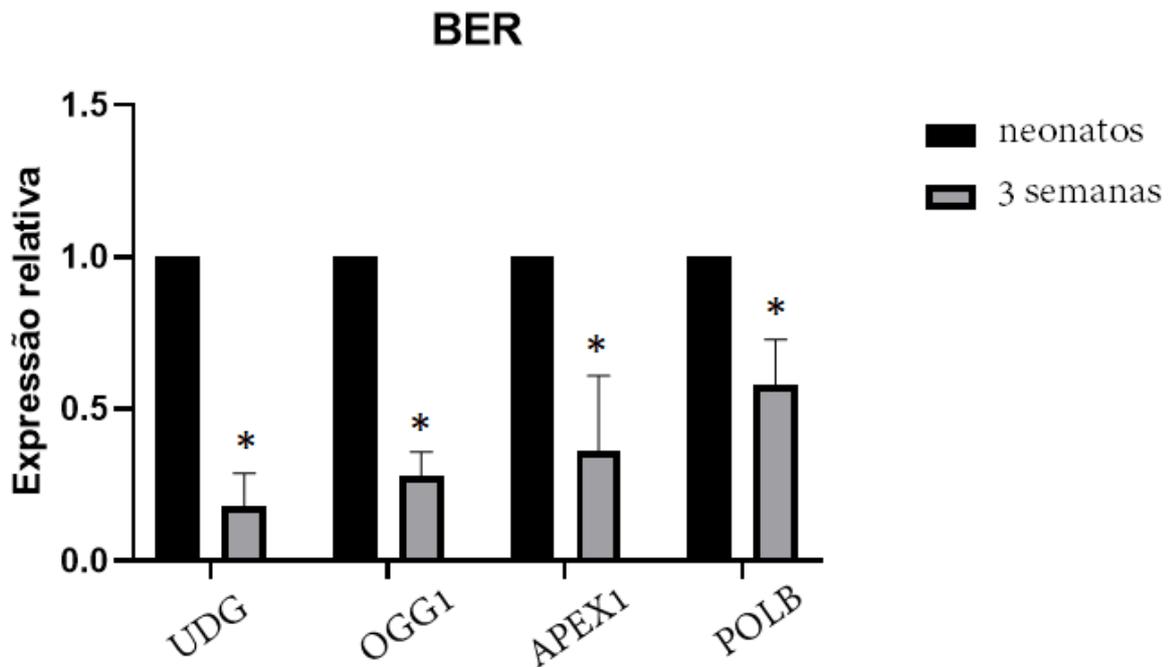


Figura 12: Análise por PCR em tempo real da expressão de mRNA de genes da via BER a partir de cDNA de EO de camundongos neonatos e com três semanas de idade; utilizando HMBS como normalizador endógeno. Os resultados são expressos como a média + desvio padrão de três réplicas biológicas, em triplicatas, de dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$).

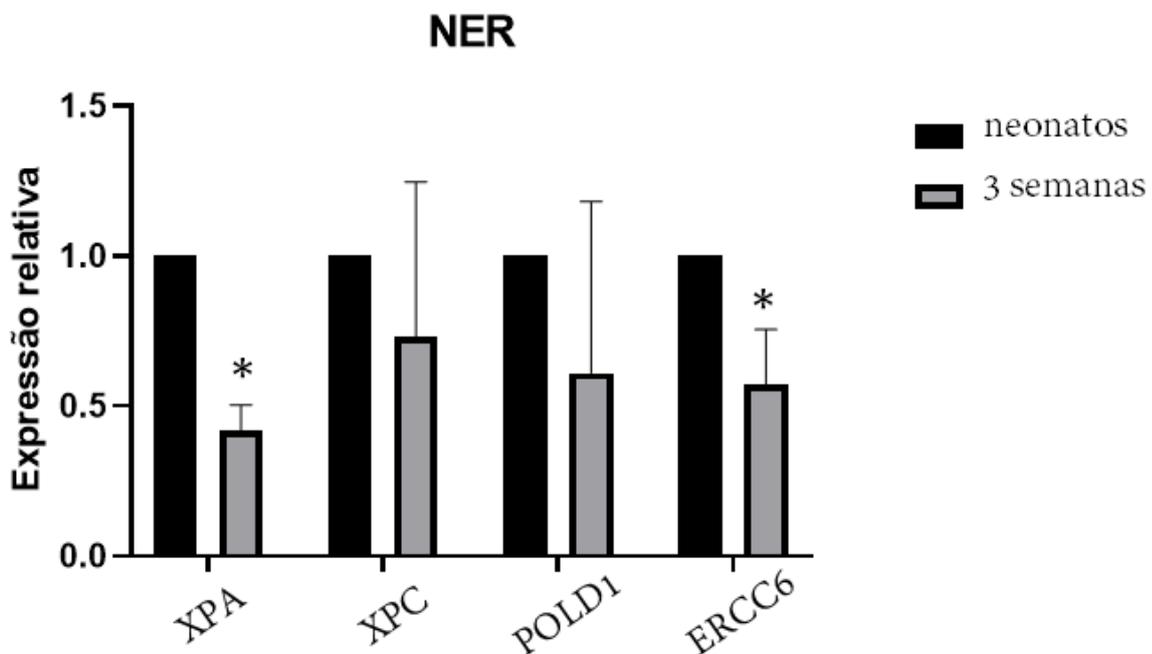


Figura 13: Análise por PCR em tempo real da expressão de mRNA de genes da via NER a partir de cDNA de EO de camundongos neonatos e com três semanas de idade; utilizando HMBS como normalizador endógeno. Os resultados são expressos como a média + desvio padrão de três réplicas biológicas, em triplicatas, de dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$).

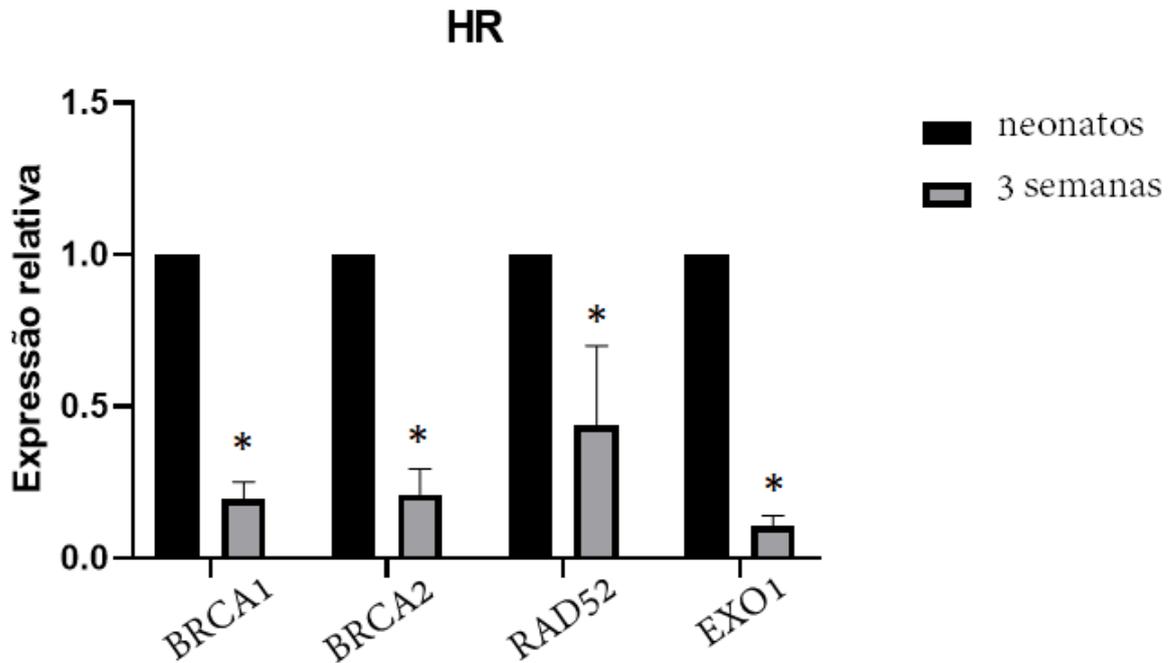


Figura 14: Análise por PCR em tempo real da expressão de mRNA de genes das via HR a partir de cDNA de EO de camundongos neonatos e com três semanas de idade; utilizando HMBS como normalizador endógeno. Os resultados são expressos como a média + desvio padrão de três réplicas biológicas, em triplicatas, de dois experimentos independentes (* $p < 0,05$).

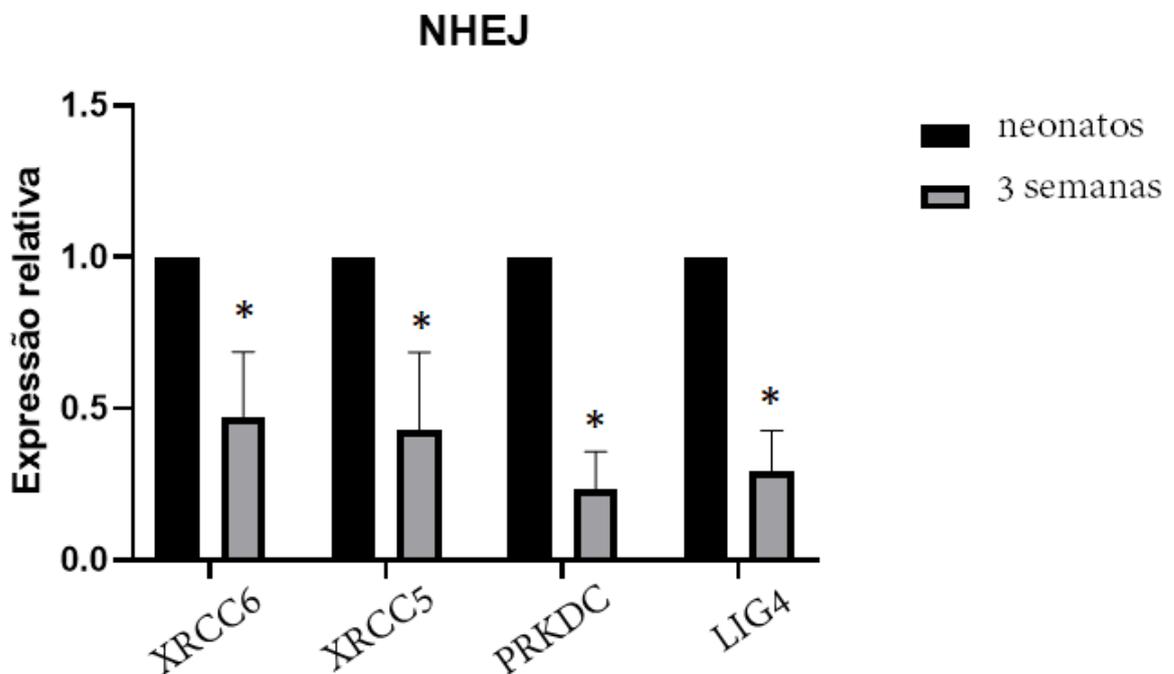


Figura 15: Análise por PCR em tempo real da expressão de mRNA de genes da via NHEJ a partir de cDNA de EO de camundongos neonatos e com três semanas de idade; utilizando HMBS como normalizador endógeno. Os resultados são expressos como a média + desvio padrão de três réplicas biológicas, em triplicatas, de dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$).

4.3 Análise da expressão de genes de reparo por hibridização *in situ*

A arquitetura do epitélio olfatório já é bem estabelecida, com os precursores de OSNs se localizando em uma camada basal e migrando ao longo do epitélio à medida que se diferenciam, de modo que a camada de interface com o ar é constituída quase que exclusivamente por esses. A técnica de hibridização *in situ* permite uma análise espacial da expressão gênica no tecido como um todo, e por isso foi utilizada para confirmar os resultados de PCR em tempo real que sugerem que há variação na expressão de genes de proteínas de reparo ao longo da diferenciação de OSNs. Para este experimento, escolhemos duas vias de reparo, consideradas as mais importantes no contexto neuronal (BER, responsável pelo reparo de danos oxidados, e NHEJ, principal via para o reparo de quebra de duplas fitas em células pós-mitóticas). Devido ao volume de trabalho associado à construção das sondas, preparação de lâminas e hibridação do tecido, escolhemos, a princípio, dois genes por via. Destes, o gene que obtivemos sucesso em todas as etapas foi a endonuclease APE1, da via de BER, cuja diminuição da expressão durante o desenvolvimento foi consistente nas análises *in silico* (**Tabelas 6 e 7**) e na análise de PCR em tempo real (**Figuras 12-15**).

A **Figura 16** apresenta imagens representativas de lâminas com cortes transversais e EO hibridizados com sonda específica para o mRNA de APE1 e contra-coradas com NBT/BCIP. Podemos observar que este gene é expresso em todo o EO (**Figura 16a**), e que há uma clara diferença na marcação entre as camadas enriquecidas com os diferentes estágios de maturação neuronal, com a marcação mais forte sendo observada na camada de precursores OSNs (**Figura 16b, C**), confirmando os dados obtidos nos resultados anteriores. É importante ressaltar, no entanto, que o sucesso desta técnica depende, dentre outras coisas, do nível de mRNA presente nas células. Os valores de FPKM de genes de reparo são baixos quando comparados a outros genes específicos de OSNs; APE1 apresenta um FPKM em torno de 5, enquanto OMP apresenta

FPKM em torno de 500. Sendo assim, ainda são necessários refinamentos desta técnica para conclusões mais robustas.

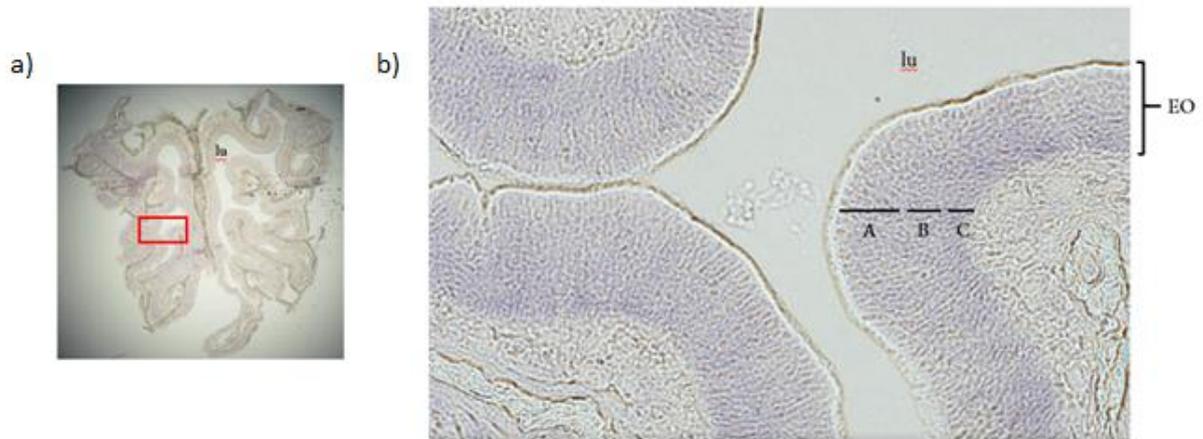


Figura 16: Imagem representativa de hibridização *in situ* para o mRNA de APE1 em cortes histológicos de EO de camundongo com 3 semanas de idade. Sondas de fita *antisense* de mRNA foram utilizadas para hibridação cromogênica no tecido. **a)** visão geral do EO e **b)** aumento de 20x em que A: camada de OSNs maduros, B: camada de OSNs imaturos e C: camada de precursores de OSNs. lu: lumen (cavidade nasal).

4.4 Análise de lesões em DNA de OSNs por PCR de longa extensão

Devido a sua localização, neurônios olfatórios, principalmente os maduros, estão constantemente expostos a agentes potencialmente genotóxicos presentes no ar (revisado em Moller et al, 2014 e Ajmani et al, 2016). No entanto, não há dados na literatura sobre os níveis de lesões em DNA nesse tipo celular, em condições fisiológicas, e os poucos dados disponíveis são pertinentes a modelos celulares expostos em condições *in vitro*. Assim, para a interpretação adequada do papel de vias de reparo de DNA da manutenção da estabilidade genômica de OSNs é fundamental determinar a quantidade de danos em DNA nessas células em condições basais. Para responder a esta pergunta, utilizamos a técnica de PCR de longa extensão, que mede lesões bloqueadoras da DNA polimerase, através da diminuição na eficiência de amplificação de moldes contendo lesões. Escolhemos, a princípio, comparar os dois tecidos compostos de neurônios relacionados ao sistema olfatório, de EO e BO. No entanto, EO apresenta neurogênese adulta e BO é constituído de neurônios provenientes da ZSV, que também

apresenta neurogênese, o que poderia influenciar os resultados uma vez que ambos tipos neuronais têm origem em populações replicativas. Assim, escolhemos um grupo controle que não passa por este processo, uma região arbitrária do córtex temporal a que chamamos de CT. O objetivo deste experimento foi, portanto, ter uma visão comparativa inicial do acúmulo de danos em: i) um tecido que passa por neurogênese adulta e está diretamente exposto aos agentes genotóxicos presentes no ar (EO); um tecido que passa por um processo de neurogênese adulta “indireta” e não está diretamente exposto ao ambiente externo (BO); e um tecido que não passa por nenhum tipo de neurogênese adulta neurogênese e não está exposto ao ambiente externo (CT).

Para esse ensaio, o número de lesões é estimado pela eficiência de amplificação de um fragmento longo, no qual a chance da polimerase do PCR encontrar lesões é maior, relativa à amplificação de um fragmento curto, para normalizar pela quantidade de DNA em cada ensaio. Os resultados das amplificações dos fragmentos longo e curto para 3 amostras de cada tecidos estão apresentados na **Figura 17**. A eficiência de amplificação dos fragmentos longos, tanto nuclear quanto mitocondrial, foi significativamente maior em OE e BO do que em CT, como demonstrando pela intensidade das bandas (**Figuras 17a e 17b**, respectivamente), enquanto que a eficiência de amplificação dos fragmentos curtos foi comparável (**Figuras 17c, 17d**), indicando quantidades equivalentes de DNA em cada amostra. Esse resultado sugere que neurônios de CT acumulam mais lesões em DNA, tanto em nDNA quanto em mtDNA.

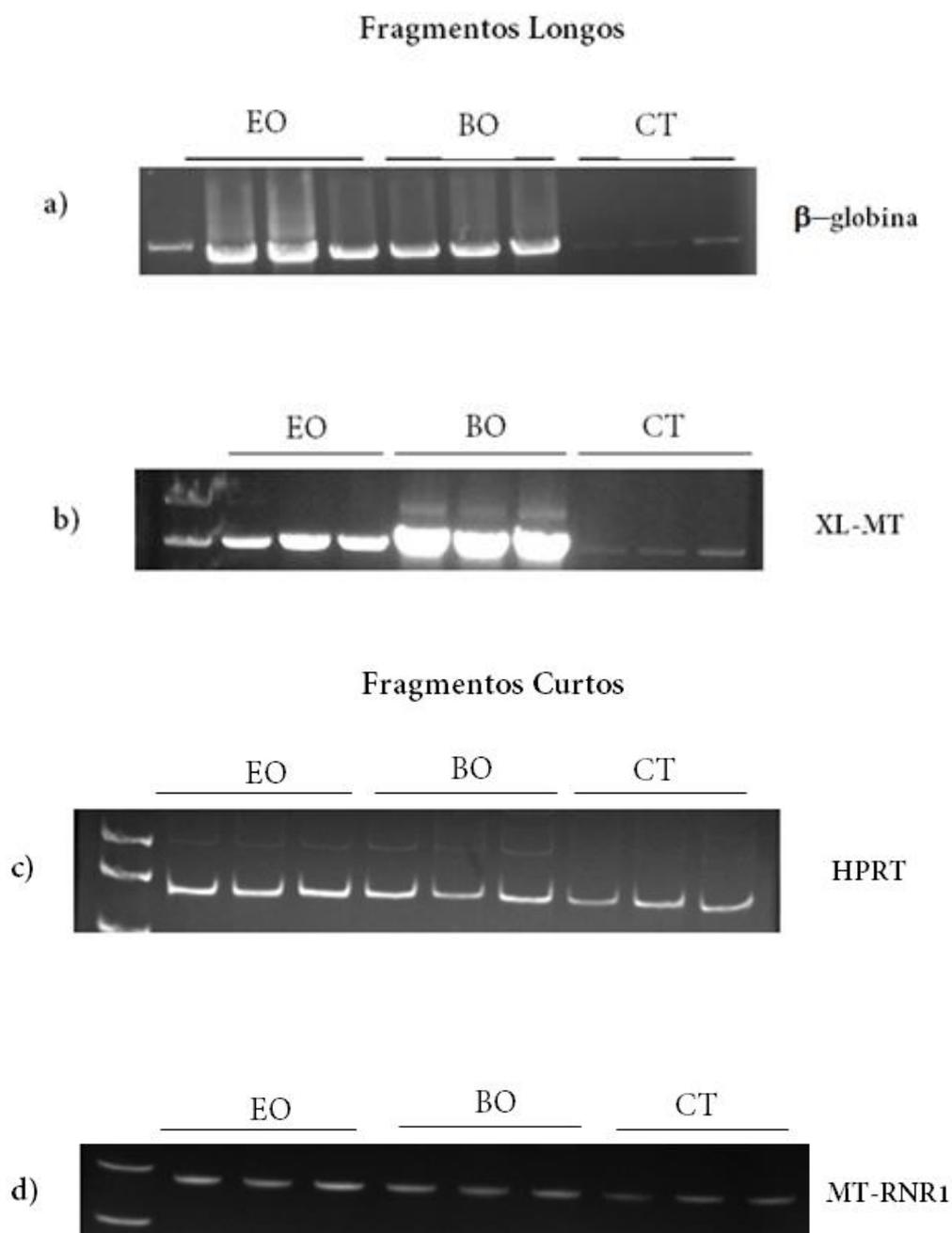


Figura 17: Géis de agarose 1% (a, b) e acrilamida 12% (c, d) após corrida dos produtos de amplificação, corados com brometo de etídeo. Fragmentos longos (a,b) e curtos (c, d) de DNA nuclear (a, c) e mitocondrial (b, d) extraídos de três réplicas biológicas (n=3) de EO, BO e CT extraídas de camundongos com três semanas de idade. Imagem representativa de três repetições independentes.

A intensidade das bandas obtidas nos géis foi utilizada para calcular a amplificação relativa de EO e BO, comparados a CT (**Figura 18**). Podemos ver, neste gráfico, que a amplificação dos fragmentos nucleares (**Figura 18a**) em EO e BO é cerca de 20 vezes maior

do que CT, enquanto a amplificação de fragmentos mitocondriais (**Figura 18b**) é cerca de 5 vezes maior nesses tecidos. Estes dados sugerem, ainda, que há mais lesões em mtDNA do que em nDNA em ambos os tecidos relacionados ao sistema olfatório.

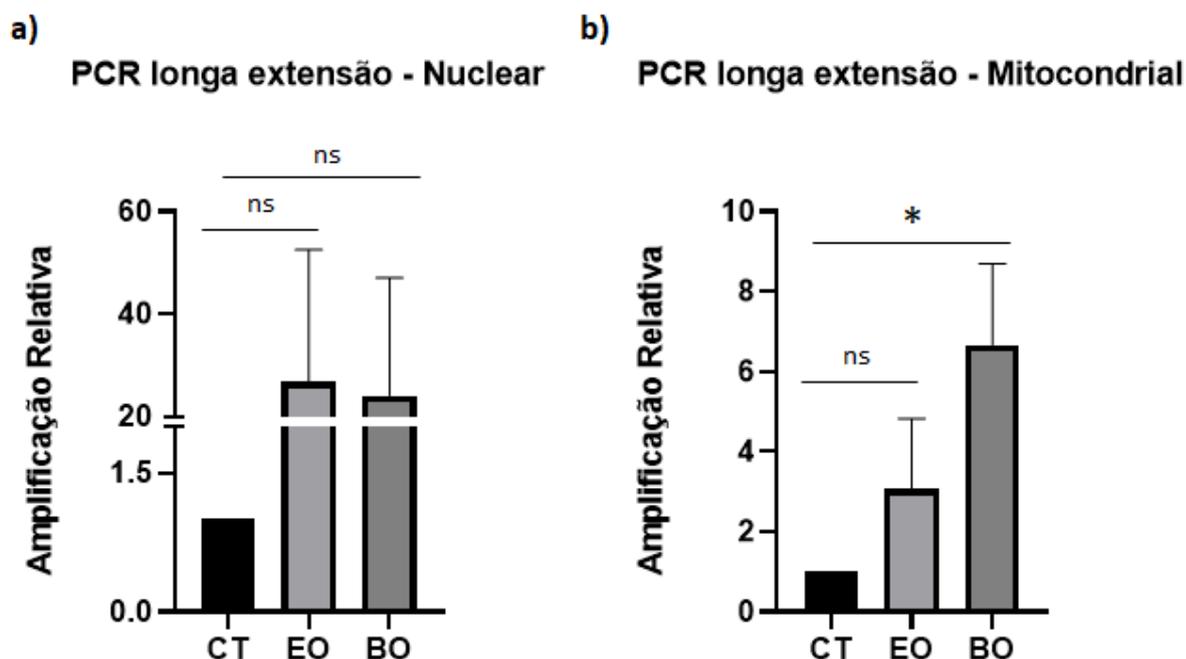


Figura 18: Quantificação da análise por PCR de longa extensão da presença de lesão no DNA **a)** nuclear (região do gene β -globina), normalizada pelo fragmento do gene HPRT de 134 bp, e **b)** mitocondrial, normalizada pelo fragmento do gene MT-RNR1 de 128bp de três réplicas biológicas (n=3) de CT, EO e BO, extraídas de camundongos com três semanas de idade. Os resultados são expressos em termos de amplificação relativa à amplificação de CT. (* $p < 0,05$ ns não significativo).

A partir dos dados de amplificação relativa, calculamos a taxa de lesão por fita de DNA de ambos tecidos do sistema olfatório (**Figura 19**). Como esse cálculo é relativo à uma amostra padrão, utilizamos o CT como “controle”. Assim, uma vez que já havíamos observado que a amplificação dos fragmentos longos foi maior em EO e BO do que em CT, as “taxas” obtidas são negativas e refletem o quanto menos lesões esses dois tecidos têm em relação ao córtex. Podemos observar que a taxa de lesão em nDNA é semelhante nos dois tecidos, mas a taxa de lesão em mtDNA é maior em EO do que em BO.

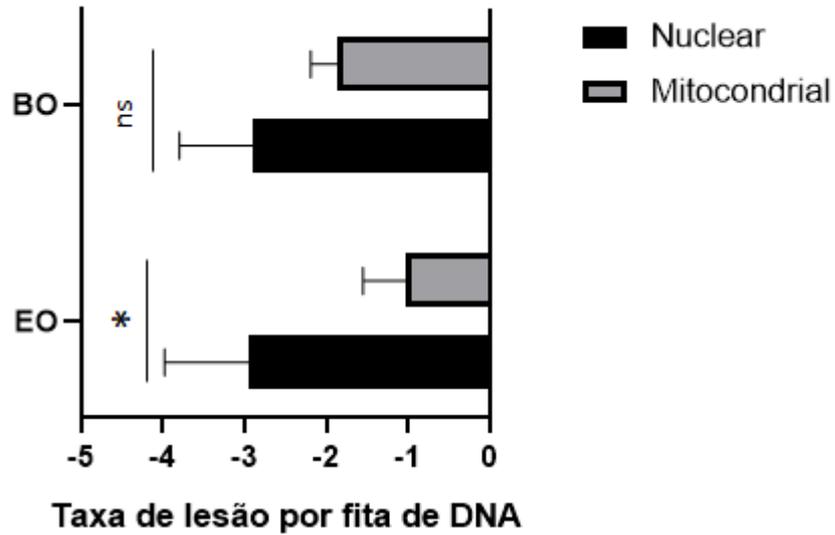


Figura 19: Medida da taxa de lesão por fita de DNA (nuclear e mitocondrial) em três réplicas biológicas (n=3) de EO e BO extraídas de camundongos com três semanas de idade, obtida por $\lambda = -\ln A_{EO,BO}/A_{CT}$, em que $A_{EO,BO}$ e A_{CT} correspondem às amplificações corrigidas (amplificação de fragmentos longos de nDNA normalizadas pelo fragmento do gene HPRT de 134 bp, e amplificação de fragmentos longos de mtDNA normalizadas pelo fragmento do gene RNR1 de 128 bp). (* $p < 0,05$ ns não significativo).

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram, para diversos tipos celulares, que a dinâmica de reparo de DNA não é constante ao longo da diferenciação celular de forma que, em geral, as vias de reparo de DNA são mais ativas em células progenitoras do que em células terminalmente diferenciadas (Sanes e Okun, 1972; Subrahmanyam et al, 1991; Byfield et al, 1975; Chan e Walker, 1976; Koval e Kaufmann, 1976; Ho e Hanawalt, 1991; Tofilon e Meyn, 1988; Murray e Meyn, 1987). Essas alterações em reparo de DNA afetam, inclusive, o nível de expressão gênica (Nospikel, e Hannawalt, 2000), uma vez que a manutenção da fidelidade da sequência nucleotídica em células em fase de divisão celular é de extrema importância para evitar mutações que possam ser passadas às células-filhas. A modulação da expressão gênica de diversos genes de reparo após estresse genotóxico também tem sido reportada (Das et al, 2005; Long et al, 2007; Tomicic, 2011). Entretanto, dados sobre o padrão de expressão de genes de reparo em OSNs se limitam àqueles presentes em grandes bibliotecas (Magklara et al, 2011; Olender et al, 2016; Scholz et al, 2016; Camargo et al, 2019), em estudos cujo foco, geralmente, está em entender processos de expressão de receptores olfatórios, e não na dinâmica de reparo. Este trabalho, portanto, se fez necessário como um primeiro passo para entender esta dinâmica.

Os resultados das análises *in silico* indicaram que todas as vias de reparo de DNA investigadas são expressas em OSNs, e que a expressão varia ao longo da diferenciação e do desenvolvimento inicial da vida do indivíduo, como reportado anteriormente em outros tipos neuronais (Sanes e Okun, 1972; Subrahmanyam et al, 1991; Byfield, 1975). Os níveis de expressão dos genes de reparo de DNA analisadas aqui são compatíveis com o nível de expressão de outras vias celulares relevantes em neurônios, como aquelas envolvidas na orientação axonal mediadas por guanosinas trifosfatases da família Rho (Rho GTPases) (revisado em O'Donnel, 2016) e na despolarização de membrana mediada por canais de íons Ca^{2+} durante a sinapse (revisado em Simms e Zamponi, 2014). Para comparação, a amplitude

dos valores de FPKM das proteínas analisadas para o conjunto de dados obtidos por (Camargo et al, 2019) foi de 1,7 – 13,5 para neonatos e 0,6 – 15,2 para camundongos de 4 semanas, comparado à uma amplitude de 1,5 – 27,1 para neonatos e 1,2 – 11,3 para camundongos de 4 semanas, de 4 genes envolvidos em sinalização de Ca^{2+} (CREB1 e GRIN2A) e orientação axonal (CXCR4 e DBN1)

É interessante notar que neurônios maduros estão em contato direto com agentes potencialmente genotóxicos presentes no ar (revisado Ajmani et al, 2016). Considerando isso, nossa hipótese inicial foi de que neurônios olfatórios maduros teriam maior expressão gênica de proteínas de reparo, em resposta ao suposto acúmulo de lesões em DNA. Vale ressaltar que não há dados na literatura comparando os níveis de lesões em DNA em precursores e neurônios olfatórios maduros, mas a observação de que vários odorantes apresentam algum nível de genotoxicidade (McGinty et al, 2011; Bhatia et al, 2013) fornece suporte para a hipótese. No entanto, os resultados obtidos aqui indicam que, ao contrário, em geral a expressão de proteínas de reparo de DNA tende a diminuir durante o desenvolvimento do epitélio e maturação dos neurônios olfatórios.

Os dados de expressão gênica obtidos através da técnica de sequenciamento de RNA permitem uma boa análise quantitativa de alterações em padrões de expressão gênica. No entanto, é importante que os resultados sejam validados utilizando outras metodologias, pois cada técnica pode conter artefatos e erros inerentes ao procedimento. Utilizando-se de mais de uma análise, é possível obter resultados mais quantitativamente fiéis. Sendo assim, observamos que os resultados obtidos por PCR em tempo real são consistentes com os dados *in silico*. Para a via de BER, nas três análises (**Tabelas 6 e 7 e Figura 12**) é possível observar expressão significativamente menor dos genes UNG e APEX1 em camundongos jovens, quando comparado com neonatos. Além disso, diferentemente do que foi observado *in silico*, também a expressão de OGG1 e POLB foi significativamente menor em camundongos jovens (**Figura**

12). Estas observações são inéditas no contexto de OSNs, mas muitos estudos anteriores já demonstraram que existe modulação nas atividades de enzimas de BER associada à idade e durante a diferenciação celular em diferentes tecidos, tanto no reparo de DNA nuclear (nDNA) quanto de DNA mitocondrial (mtDNA). Foi proposto por (Hildestrand *et al.*, 2007) que os níveis de OGG1 são mais baixos em neurônios totalmente diferenciados do que seus precursores. Por outro lado, Souza-Pinto *et al.*, 1999 já haviam demonstrado anteriormente que a atividade dessa enzima aumenta em mitocôndrias hepáticas de ratos durante o envelhecimento. Mais recentemente, (Sykora *et al.*, 2013) mostraram que a linhagem humana de neuroblastoma SH-SY5Y é mais suscetível a lesões induzidas por agentes oxidativos, mas não por agentes alquilantes, devido a diminuição em diversos fatores associados à via de BER em células diferenciadas. Devido a estas diminuições, há um consenso baseado em diversas evidências de que existe acúmulo de danos ao nDNA e mtDNA com a idade e em células terminalmente diferenciadas (Nospikel, 2007), e que a via BER desempenha um papel importante associado ao envelhecimento e à neurodegeneração (revisado em Maynard *et al.*, 2015). De fato, nosso grupo demonstrou recentemente que a atividade de UDG é significativamente menor em núcleos e mitocôndrias obtidos de diferentes regiões cerebrais de portadores de doença de Alzheimer (DA) quando comparados com indivíduos normais e com indivíduos com índices neuropatológicos de DA mas que não apresentavam déficit cognitivo (Soltys *et al.*, 2019).

A etapa de reconhecimento das lesões na via de NER pode ser mediada por duas subvias distintas, em que uma delas é associada à transcrição (TCR, do inglês *transcription coupled repair*) e outra consiste no escaneamento constante do genoma (GGR, do inglês *global genome repair*). Assim, seria intuitivo propor que em células terminalmente diferenciadas, a via TCR-NER seria mais relevante, uma vez que células pós-mitóticas não replicam seu DNA. Dos genes que codificam proteínas da via NER analisados aqui, CSB é necessária para o reconhecimento de lesões na subvia TCR-NER e XPC na subvia GGR-NER, enquanto XPA e POLD são

comuns às duas subvias. Enquanto a análise dos transcriptomas mostrou diminuição apenas na expressão de POLD durante o desenvolvimento, os resultados obtidos com PCR em tempo real indicam que, também em OSNs, a via NER está diminuída em epitélio olfatório maduro, provavelmente refletindo a diferenciação dos neurônios olfatórios. Esses resultados estão em acordo com dados da literatura que mostram que mesmo vias de reparo associadas à transcrição foram atenuadas após a diferenciação neuronal e em outros tipos celulares (Sanes e Okun, 1972; Subrahmanyam et al, 1991; Byfield, 1975; Chan e Walker, 1976; Koval e Kaufmann, 1976; Ho e Hanawalt, 1991; Tofilon e Meyn, 1988; Murray e Meyn, 1987).

Quebras de fita dupla de DNA são lesões altamente citotóxicas, e não é inesperado que sejam reparadas por pelo menos duas vias distintas, HR e NHEJ, que, de maneira geral, atuam em diferentes fases do ciclo celular, aonde HR parece estar limitada às fases S tardia e G2 (Bernstein e Rothstein, 2009). Parte desse efeito deve estar relacionado à disponibilidade da cromátide-irmã, como região homóloga, apenas nessas fases do ciclo. Como discutido no item 4.1, neurônios maduros, devido à sua diferenciação terminal, contam basicamente com a via de NHEJ para reparar este tipo de dano. Assim, seria plausível propor que a expressão de genes que codificam proteínas essenciais dessa via seria preservada durante a diferenciação. Entretanto, os resultados obtidos da análise por PCR em tempo real também indicam que a expressão de proteínas desta via é menor em camundongos jovens do que em neonatos, assim como dos genes das proteínas da via HR (**Figuras 14 e 15**). A importância da via de HR em progenitores de neurônios já foi demonstrada em estudos anteriores (Rousseau *et al.*, 2012). (Orii *et al.*, 2006) demonstraram, utilizando dois grupos de camundongos, um deficiente em HR e outro, e NHEJ, que estas duas vias são espaço-temporalmente distintas: a inativação de HR se mostrou crucial nos primeiros estágios de embriogênese, levando ao aumento de apoptose, enquanto a ausência de NHEJ teve consequências deletérias somente em estágios tardios do desenvolvimento, caracterizados pela alta taxa de diferenciação. Este estudo sugere

que HR tem um papel protetivo contra citotoxicidade induzida por quebras de dupla fita em células proliferativas, tornando-se dispensáveis em células pós-mitóticas. Por outro lado, nossos resultados parecem indicar que a via de NHEJ também é diminuída durante a diferenciação. No entanto, essas análises não permitem avaliar se os níveis de expressão observados nos neurônios maduros ainda são suficientes para manter a estabilidade genômica e preservar a integridade celular.

Embora nossos resultados de hibridização *in situ* sejam preliminares, as imagens demonstram uma forte tendência de diminuição de transcritos de APE1 nas camadas enriquecidas com células diferenciadas. Este dado vai ao encontro de nossos resultados anteriores e com dados da literatura, discutidos nos parágrafos anteriores, de que a via de BER, de maneira geral, é mais ativa em precursores de neurônios. Hildestrand e colegas (Hildestrand et al., 2007) demonstraram, também utilizando a técnica de hibridização *in situ*, que células progenitoras de neurônios possuem maior capacidade de remover a base oxidada 8-hidroxi-doxiguanina (8-OHdG) do que células diferenciadas. Esta base modificada é uma das lesões oxidadas mais abundantes em condições fisiológicas (revisado em Fortini et al, 2003), e é removida pela enzima 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) (Dianov et al, 1998), que inicia a via de BER.

A partir dos resultados obtidos acima, propusemos a hipótese de que OSNs acumulariam mais danos em seu genoma do que neurônios presentes no SNC, pelo fato destes estarem protegidos pelo crânio e, conseqüentemente, não estarem em contato direto com agentes genotóxicos externos. Ao contrário, nossos resultados obtidos através de PCR de longa extensão (**Figuras 17 e 18**) sugeriram que há um maior acúmulo de danos em DNA extraído da região CT, que não passa por nenhum tipo de neurogênese adulta, e não está exposta ao ambiente externo. Os resultados obtidos nesse ensaio foram inesperados, e não suportam a hipótese inicial de que neurônios olfatórios acumulam mais lesões em DNA devido à constante exposição. Por

outro lado, considerando que uma diferença fundamental entre os tecidos EO e BO e o córtex é a presença de algum tipo de neurogênese adulta, podemos especular que a manutenção da integridade genômica é necessária para a manutenção da capacidade replicativa, resultando em maior integridade do DNA em tecidos replicativos. Como não avaliamos aqui a expressão de genes de proteínas de reparo em outros tecidos neurais além do epitélio, não podemos correlacionar os dois eventos em nossas condições experimentais. No entanto, dados anteriores relacionando processos de neurogênese e reparo de DNA no hipocampo mostraram que a manutenção da neurogênese parece ser dependente de BER, uma vez que progenitores de neurônios de camundongos idosos nocauteados para uma DNA glicosilase bifuncional presente em BER apresentaram capacidade proliferativa diminuída, além da atividade de reparo reduzida (Regnell et al, 2012). Outros estudos seriam necessários para entender melhor esta dinâmica entre neurogênese versus reparo.

Por outro lado, nossos resultados sugerem que há maior acúmulo de danos ao mtDNA em EO do que em BO (**Figura 18b**), o que corrobora com nossa hipótese inicial, uma vez que ambos tecidos passam por algum tipo de neurogênese, mas apenas o EO está exposto ao ambiente externo. Este dado, no entanto, é particularmente interessante quando avaliado do ponto de vista da natureza do processo de neurogênese. Neurônios no BO não passam pelo processo de replicação neste tecido, mas sim na região da SZV, antes de migrarem, enquanto amadurecem, para o BO. Sendo assim, é possível especular que as células que compõem este tecido passam por uma “limpeza” de conteúdo genético, de modo que apenas o DNA mais íntegro chegue ao seu destino, enquanto que o DNA que sofreu lesões inerentes à replicação seja eliminado durante a migração. No EO o processo ocorre na mesma região, de modo que células que contenham os danos inerentes à replicação permaneçam próximas as células cujo DNA é mais íntegro. Isto é, podemos especular que a diferença nos níveis de lesão observada pode ser atribuída ao contato com o ambiente externo, mas também da diferença no processo

de neurogênese adulta que estas regiões apresentam, que confere diferentes naturezas às amostras obtidas neste estudo.

Além disso, ao compararmos as taxas de lesão no nDNA e mtDNA (**Figura 19**), observamos que este último acumula significativamente mais lesões no EO. Esse resultado é consistente com dados da literatura que já mostraram anteriormente que mtDNA é mais suscetível e acumula danos por mais tempo do que nDNA (Yakes e van Houten, 1997). Além disso, por estar fisicamente próximo da cadeia transportadora de elétrons, potencialmente geradora de espécies reativas de oxigênio, o mtDNA é um alvo preferencial para o ataque de EROs (Bohr *et al.*, 2002; Stuart *et al.*, 2005). Mais uma vez, podemos especular que a natureza do processo de neurogênese adulta em cada tecido pode influenciar neste dado. O EO, tendo em sua composição células replicativas, demanda alto consumo energético para a formação de ATP, o que poderia resultar na formação de mais EROs e, conseqüentemente, mais danos ao mtDNA. Entretanto, a alta concentração de O₂ no ambiente em que se situa este tecido (Chen *et al.*, 2018), comparativamente ao ambiente intra-cranial, também pode ter algum papel na natureza das lesões. Seriam necessários outros experimentos para testar tais hipóteses, que não foram realizados neste estudo.

A integridade do mtDNA é de extrema importância para a manutenção da homeostase celular, principalmente em se tratando de células cujo metabolismo energético é predominantemente oxidativo, como os neurônios. O acúmulo de danos ao mtDNA eventualmente leva a mitofagia e autofagia; o que, no contexto neuronal, está associado ao envelhecimento e neurodegeneração (Batlevi e Spada, 2011, McWilliams *et al.*, 2018). Por outro lado, vários grupos, incluindo o nosso, já demonstraram que mitocôndrias de células de mamíferos são proficientes em BER, que remove a maioria das modificações causadas por oxidação (Muftuoglu *et al.*, 2014). No contexto de neurônios olfatórios, esta associação ainda não está descrita na literatura, embora tenha sido reportado recentemente que a deficiência de

BER leva à diminuição da capacidade olfatória e morte neuronal no BO em camundongos selvagens e em modelos da doença de Alzheimer (Canugovi et al, 2015; Misiak et al, 2017).

Em conjunto, nossos resultados dão um passo inicial para o melhor entendimento da dinâmica de reparo de DNA em OSNs, mostrando que a expressão de genes das vias de BER, NER, NHEJ e HR, que removem a maioria das lesões ao DNA, são menos expressos em camundongos jovens do que em neonatos, provavelmente devido à mudança na composição celular do EO e, portanto, possivelmente o padrão de expressão destes genes decai conforme a diferenciação destas células. Além disso, o mtDNA de OSNs acumula mais lesões do que outras regiões no SNC, mas o mesmo não ocorre para nDNA. É possível que o processo de neurogênese deste tecido desempenhe um papel compensatório, de maneira que as células sejam repostas antes que as lesões se acumulem de forma significativa, porém são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados indicam que OSNs expressam genes de todas as vias canônicas de reparo de DNA analisadas, e que sua expressão varia ao longo do desenvolvimento e maturação neuronal. Os dados obtidos indicam fortemente que a expressão de enzimas de reparo em OSNs diferenciados é menor do que a observada em seus precursores, consistente com dados da literatura em contexto neuronal não-olfatório e outros tipos celulares. Uma vez que a citotoxicidade de lesões em DNA e a formação de mutações ambas dependem da maquinaria de replicação, células em divisão demandam grande atividade de reparo para evitar bloqueios e erros de replicação que possam vir a resultar em morte celular e mutações. Uma vez diferenciadas, a chance de lesões bloqueadoras serem “encontradas” é limitada à atividade da RNA polimerase, e com isso a dependência das vias de reparo, de maneira geral, cai, embora ainda seja relevante no contexto de transcrição. Esta dinâmica parece estar presente também em neurônios olfatórios, apesar de sua localização diferenciada.

Mostramos, ainda, que neurônios relacionados ao sistema olfatório, provenientes de linhagem germinativa (isto é, passam por processo de neurogênese adulta) acumulam menos dano ao DNA, tanto nuclear, como mitocondrial, do que neurônios do SNC, apesar de estarem constante e diretamente em contato com agentes potencialmente genotóxicos. Além disso, nossos resultados sugerem que neurônios do epitélio olfatório acumulam mais lesões no DNA mitocondrial do que neurônios do bulbo olfatório. Esta observação está em acordo com muitos dados da literatura que indicam que o DNA mitocondrial é mais suscetível a danos oxidados do que o DNA nuclear (Yakes e van Houten, 1997), devido a sua proximidade com a cadeia transportadora de elétrons. O metabolismo energético neuronal é quase exclusivamente oxidativo, e com isso neurônios consomem significativamente mais oxigênio do que outros tecidos. Considerando que neurônios olfatórios estão expostos a concentração de O₂ bastante mais alta do que outros neurônios (cerca de 20% de O₂, ou 152 Torr, concentração atmosférica

vs cerca de 2,53 Torr, concentração no tecido na região do córtex (Chen et al, 2018)), podem ser ainda mais propensos à formação de EROs e, portanto, ainda mais sensíveis a danos ao DNA mitocondrial.

Nosso trabalho caracteriza, pela primeira vez, quais vias de reparo de DNA são expressas em epitélio olfatório murinho, e como a expressão de genes dessas vias varia ao longo do processo de maturação neuronal. Esses resultados estabelecem uma base conceitual para estudos sobre a dinâmica de reparo de DNA nestas células, que apresentam características celulares e funcionais bastante particulares. A relevância de nossos resultados é evidente, e acreditamos que seja interessante estudos com camundongos ainda mais velhos, tanto de expressão gênica quanto de acúmulo de dano ao DNA, para buscar entender melhor essa dinâmica ao longo do envelhecimento e no contexto de neurodegeneração.

7. REFERÊNCIAS

- ALTMAN J., DAS, G. D. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335; 1965.
- AJMANI, G.S et al. Effects of ambient air pollution exposure on olfaction: A review. *Environmental Health Perspectives*, v. 124, n. 11, p. 1683–1693, 2016.
- Attens, J.; Walker, L.; Jellinger, K. A. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*. 127: 459-475; 2014.
- BALASUBRAMANIAN, B.; POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 17, p. 9738–9743, 2002.
- Batlevi, Y.; La Spada, A. R. Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiology of Disease*. 43(1):46-51; 2011.
- Bernstein, K. A.; Rothstein, R. At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell*. 137(5): 807-810. 2009.
- Berra, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; 2009.
- BHATIA, S. P.; POLITANO, V. T.; API, A. M. Evaluation of genotoxicity of nitrile fragrance ingredients using in vitro and in vivo assays. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 784–792, 2013.
- Bianchi, P.; Bettini, S.; Guidi, S.; Ciani, E.; Trazzi, S.; Stagni, F.; Ragazzi, E.; Franceschini, V.; Bartesaghi, R. Age-related impairment of olfactory bulb neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Experimental Neurology*. 251: 1-11; 2013
- Bohr, V. A.; Stevnsner, T. V.; Souza-Pinto, N. C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*. 286(1): 127-134. 2002.
- Brann, J. H.; Firestein, S. J. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in Neuroscience*. 8:182; 2014.
- BRIANESE, R. C. et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: A comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 167, n. 3, p. 803–814, 2018.
- BYFIELD, J.E. et al. Effect of differentiation on the repair of DNA single-strand breaks in neuroblastoma cells, *Biochem. Biol. Res. Commun*. 63 (1975) 730–735.
- CANUGOVI, C. et al. Loss of NEIL1 causes defects in olfactory function in mice. *Neurobiology of Aging*, v. 36, n. 2, p. 1007–1012, 2015.
- CAMARGO, A. P. et al. Uncovering the mouse olfactory long non-coding transcriptome with a novel machine-learning model. v. 0, n. 0, p. 1–14, 2019. CHAN, A.C.; WALKER, I.G. Reduced DNA repair during differentiation of a myogenic cell line, *Journal of Cell Biology*, v.70, p. 685–691. 1976.

- CHATERJEE, N.; WALKER G. C. Mechanisms of DNA Damage, Repair and Mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 58(5): 235:263. 2017.
- CHEN, R. et al. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, n. October, p. 1–12, 2018.
- Cheung, M. C.; Jang, W.; Schwob, J. E.; Wachowiak, M. Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Frontiers in Neural Circuits*. 7:207 1-16; 2014.
- Cone, C. D. Jr.; Cone, C. M. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Nature*. 192: 155-157; 1976.
- Conley, D. B.; Robinson, A. M.; Shinnars, M. J.; Kern, R. C. Age-Related Olfactory Dysfunction: Cellular and Molecular Characterization in the Rat. *American Journal of Rhinology*. 17(3): 169-175; 2016.
- Cooper-Kuhn, C. M.; Kuhn, H. G. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Developmental Brain Research*. 134(1-2):13-21; 2002.
- DAS, A. et al. Induction of the human oxidized base-specific DNA glycosylase NEIL1 by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 42, p. 35272–35280, 2005.
- Davis, A. J.; Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*. 2(3): 130-143; 2013.
- DIANOV, G. et al. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 50, p. 33811–33816, 1998.
- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 2013.
- DICKINSON, B. C. Metabolism: Plugging the leak. *Nature Chemical Biology*, v. 11, n. 11, p. 831–832, 2015.
- Doty, R. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*. 8: 329-339; 2012.
- DOETSCH, F. et al. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell*, v. 97, p. 703–716, 1999.
- Firestein, S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 413: 211-218; 2001.
- 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.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D’Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E., 2003. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85, 1053–1071.
- Friedberg, E. C.; Meira, L. B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair*. 5: 189-209; 2006.
- Friedberg, E.C. DNA damage and repair. *Nature*, 421, 436–440. 2003

- Gage, F. H. Neurogenesis in the Adult Brain. *Journal of Neuroscience*. 22 (3) 612-613; 2002.
- GAGE, B. F. H. Adult neurogenesis in mammals. v. 364, n. 6443, 2019.
- Genschel J, Modrich P. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell* 12:1077–1086. 2003
- GHANBARI, H. A. et al. Oxidative damage in cultured human olfactory neurons from Alzheimer's disease patients. *Aging Cell*, v. 3, n. 1, p. 41–44, 2004.
- HANAWALT, P. C.; NOUSPIKEL, T. Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. *Molecular and cellular biology*, v. 20, n. 5, p. 1562–70, 2000.
- Hildestrand, G. A.; Diep, D. B.; Kunke, D.; Bolstad, N.; Bjoras, M.; Krauss, S.; Luna, L. The capacity to remove 8-oxoG is enhanced in newborn neural stem/progenitor cells and decreases in juvenile mice and upon cell differentiation. *DNA repair*. 6(6): 723-732. 2007.
- HO, L. HANAWALT, P.C. Gene-specific DNA repair in terminally differentiating rat myoblasts, *Mutat. Res. DNA Repair* 255 (1991) 124–141.
- Ishii, T.; Omura, M.; Mombaerts, P. Protocols for two- and three-color fluorescent RNA in situ hybridization of the main and accessory olfactory epithelia in mouse. *Journal of neurocytology*. 33(6): 657–69; 2004.
- JAMES, P. A. et al. The Angelina Jolie effect. *Medical Journal of Australia*, v. 199, n. 10, p. 646, 2013.
- JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, v. 94, n. 2, p. 166–200, 2011.
- Jorm, A. F.; Korten, A. E.; Henderson, A. S. The prevalence of dementia: A quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 76: 465-479; 1987.
- Kishikawa, M.; Iseki, M.; Sakae, M.; Kawaguchi, S.; Fujii, H. Early diagnosis of Alzheimer's? *Nature*. 369: 365-366; 1994.
- Kety, S. S. The general metabolism of the brain in vivo In: Richter D, editor. *Metabolism of the nervous system*. London: Pergamon (1957) 221–237.
- KOVAL, T.M.; KAUFFMAN, S.J. Maintenance of DNA repair capacity in differentiating rat muscle cells in vitro, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 403–405.
- Kovalenko, O. A.; Santos, J. H. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. *Current Protocols in Human Genetics*. 19(1): 1-13, 2009.
- Lambert, A. J.; Brand, M. D. Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. *Methods in Molecular Biology*. 554:165-81; 2009.
- LOIS, C.; ALVAREZ-BUYIIA, A. Long-Distance Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148. 1994.
- LONG, X. H. et al. Dose-dependent expression changes of early response genes to ionizing radiation in human lymphoblastoid cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 19, n. 4, p. 607–615, 2007.

- NAGAI, M. H.; ARMELIN-CORREA, L. M.; MALNIC, B. Monogenic and Monoallelic Expression of Odorant Receptors. *Molecular Pharmacology*, v. 90, n. 5, p. 633–639, 2016.
- Machado, C. F.; Nagai, M. H.; Lyra, C. S.; Reis-Silva, T. M.; Xavier, A. M.; Glezer, I.; Felicio, L. F.; Malnic, B. Conditional Deletion of *Ric-8b* in Olfactory Sensory Neurons Leads to Olfactory Impairment. *Journal of Neuroscience*. 37(50): 12202-12213; 2017.
- Magklara, A.; Yen, A.; Colquitt, B. M.; Clowney, E. J.; Allen, W.; Markenscoff-Papadimitriou, E.; Evans, Z. A.; Kheradpour, G.; Mountoufaris, G.; Carey, C.; Barnea, G.; Kellis, M.; Lomvardas, S. An Epigenetic Signature for Monoallelic Olfactory Receptor Expression. *Cell*. 145: 555–570; 2011.
- MARTEIJN, J. A. et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 7, p. 465–481, 2014.
- MAYNARD, S. et al. DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 10, p. 1–18, 2015.
- MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on ethylene brassylate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. SUPPL. 2, p. S174–S182, 2011.
- MENCK, C. F. M.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genetics and Molecular Biology*, v. 37, n. 1 SUPPL. 1, p. 220–233, 2014.
- Michaloski JS, Galante PAF, Nagai MH, Armelin-Correa L, Chien MC, Matsunami H, Malnic B. Common Promoter Elements in Odorant and Vomeronasal Receptor Genes. *Plos One*. 2011; 6(12): e29065.
- MISIAK, M. et al. DNA polymerase β decrement triggers death of olfactory bulb cells and impairs olfaction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, v. 16, n. 1, p. 162–172, 2017.
- MØLLER, P. et al. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 762, p. 133–166, 2014.
- MURRAY, D.; MEYN, R.E. Differential repair of gamma-rayinduced DNA strand breaks by various cellular sub-populations of mouse jejunal epithelium and bone marrow in vivo, *Radiat. Res.* 109 (1987) 153–164.
- Nakahara, T. S. Caracterização molecular e funcional de receptores da classe OR expressos no órgão vomeronasal de mamíferos. (Dissertação de Mestrado) Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil; 2014.
- NICKELL, M. D. et al. Genomics of mature and immature olfactory sensory neurons. *Journal of Comparative Neurology*, v. 520, n. 12, p. 2608–2629, 2012.
- Nospikel T. 2007. DNA repair in differentiated cells: Some new answers to old questions. *Neuroscience* 145:1213–1221.
- O'DONNELL, M.; CHANCE, R. K.; BASHAW, G. J. Axon Growth and Guidance: Receptor Regulation and Signal Transduction. *Annual Review of Neuroscience*, v. 32, n. 1, p. 383–412, 2009.
- OLENDER, T. et al. The human olfactory transcriptome. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2016.

- Orii, K. E.; Lee, Y.; Kondo, N.; McKinnon, P. J. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27;103(26):10017-22. 2006.
- Peltomäki, P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research*. 488: 77-85; 2001.
- PERRY, G. et al. Oxidative damage in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, v. 106, n. 6, p. 552–556, 2003.
- Pffaf, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1;29(9):e45; 2001.
- REGNELL, C. E. et al. Hippocampal adult neurogenesis is maintained by Neil3-dependent repair of oxidative DNA lesions in neural progenitor cells. *Cell Reports*, v. 2, n. 3, p. 503–510, 2012.
- REID-BAYLISS, K. S. et al. Why Cockayne syndrome patients do not get cancer despite their DNA repair deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 36, p. 10151–10156, 2016.
- Renkawitz, J.; Lademann, C. A.; Jentsch, S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(6): 369-83; 2014.
- RIKSSON, P. E. S. E. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.
- ROCHA, C. R. R. et al. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 752, n. 1, p. 25–35, 2013.
- ROGERS, L. K.; CISMOWSKI, M. J. Oxidative stress in the lung – The essential paradox. *Current Opinion in Toxicology*, v. 7, n. 2017, p. 37–43, 2018.
- Rousseau, L. Etienne, O.; Roque, T.; Desmaze, C.; Haton, C.; Mouthon, M.A.; Bernardino-Sgherri, J.; Essers J.; Kanaar, R.; Boussin, F. D. In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. *PLoS One*. 7(5):e3719; 2012.
- Sailor, K. A.; Schinder, A. F.; Lledo, P. M. Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 42: 111-117; 2017.
- Sancar, A. Lindsey-Boltz, L. A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Reviews in Biochemistry*. 73:39–85; 2004.
- SANES J.R.; OKUN, L.M. Induction of DNA synthesis in cultured neurons by ultraviolet light or methyl methane sulfonate, *Journal of Cell Biology*., v.53, p. 587–590. 1972.
- SCHAFFER, S. T.; GAGE, F. H. Review Adult Neurogenesis in the Hippocampus : From Stem Cells to Behavior. p. 897–914, 2016.
- Schmidt, M. H. M.; Pearson, C. E. Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA repair*. 38: 117-126; 2016.
- SCHOLZ, P. et al. Transcriptome analysis of murine olfactory sensory neurons during development using single cell RNA-Seq. *Chemical Senses*, v. 41, n. 4, p. 313–323, 2016.

Schwob, J. Neural Regeneration and the Peripheral Olfactory System. *The Anatomical Record*. 269:33–49; 2002.

Schwob, J. et al. Stem and Progenitor Cells of the Mammalian Olfactory Epithelium: Taking Poietic License. *Journal of Comparative Neurology*. 525(4): 1034–1054, 2018.

SCULLY, R. et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019.

SIMMS, B. A.; ZAMPONI, G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, v. 82, n. 1, p. 24–45, 2014.

SOLTYS, D. T.; PEREIRA C. P. M.; ROWIES F. T. et al. Lower mitochondrial DNA content but not increased mutagenesis associates with decreased base excision repair activity in brains of AD subjects. *Neurobiology of Aging*, v. 73, p. 161–170, 2019.

Souza-Pinto, N. C.; Croteau, D. L.; Hudson, E. K.; Hansford, R. G.; Bohr, V. A. Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 27(8): 1935- 1942.

Souza-Pinto, N. C.; Houge, B.; Bohr, V. A. DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radical Biology & Medicine*. 30(8): 916-923; 2001.

Souza-Pinto, N. C.; Wilson III, D. M.; Stevnsner, T. V.; Bohr, V. A. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA repair*. 7: 1098-1109. 2008.

Stuart, J. A.; Maynard, S.; Hashiguchi, K.; Souza-Pinto, N. C.; Bohr, V. A. Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Research*. 33(12):3722-32; 2005.

SUBRAHMANYAM, K.; RAO, K.S. Ultraviolet light-induced unscheduled DNA synthesis in isolated neurons of rat brain of different ages, *Mech. Ageing Dev.* 57 (1991) 283–291.

Sultan-Styne, K.; Toledo, R.; Walker, C.; Kallkopf, A.; Ribak, C. E.; Guthrie, K. M. Long-term survival of olfactory sensory neurons after target depletion. *Journal Comparative Neurology*. 515(6): 696–710; 2009.

SYKORA, P. et al. DNA polymerase β deficiency leads to neurodegeneration and exacerbates Alzheimer disease phenotypes. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 2, p. 943–959, 2015.

Talamo, B. R.; Rudel, R.; Kosik, K. S.; Lee, V. M.-Y.; Neff, S.; Adelman, L.; Kauer, J. S. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature*. 337: 736-739; 1989.

TOFILON, P.J; MEYN, R.E. Influence of cellular differentiation on repair of ultraviolet-induced DNA damage in murine proadipocytes, *Radiat. Res.* 116 (1988) 217–237.

TOMICIC, M. T. et al. Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptive response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 10, p. 1785–1798, 2011.

VALAVANIDIS, A. et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n. 9, p. 3886–3907, 2013.

Velayudhan, L.; Lovestone, S. Smell Identification Test as a Treatment Response Marker in Patients With Alzheimer Disease Receiving Donepezil. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 29: 387-390; 2009.

Wang, X.; Spandidos, A.; Wang, H.; Seed, B. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:D1144-9

Wood, R. D. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(38): 23465-23468; 1997.

Yakes, F. M.; Houten, B. V. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(2): 514–519. 1997.

8. APÊNDICES

Apêndice A – Padronização de *primers*

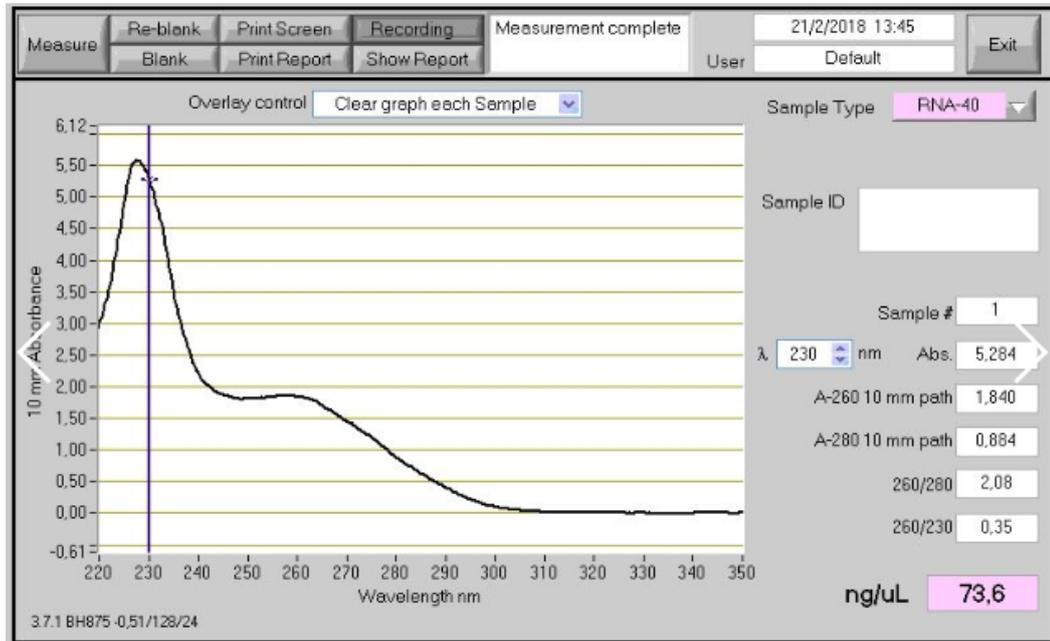


Imagem representativa do espectro de absorção de amostra de tecido neuronal no equipamento NanoDrop, apresentando provável contaminação, portanto inadequada para ser utilizada na padronização dos *primers*.

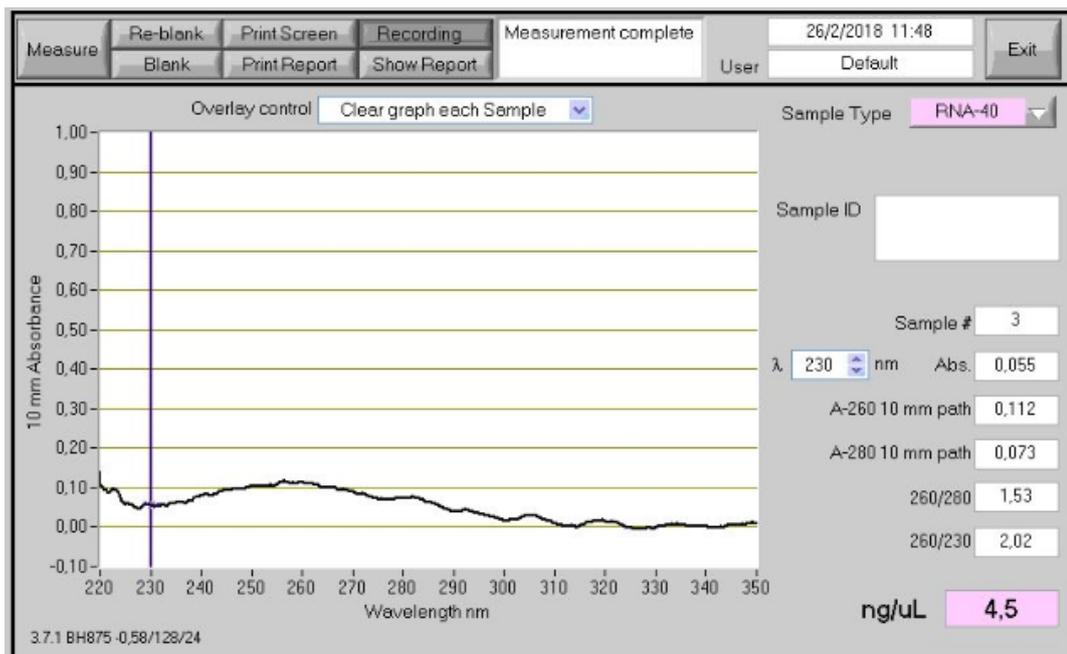


Imagem representativa do espectro de absorção de amostra de tecido neuronal no equipamento NanoDrop, após precipitação com etanol, apresentando baixa concentração, portanto inadequada para ser utilizada na padronização dos *primers*.

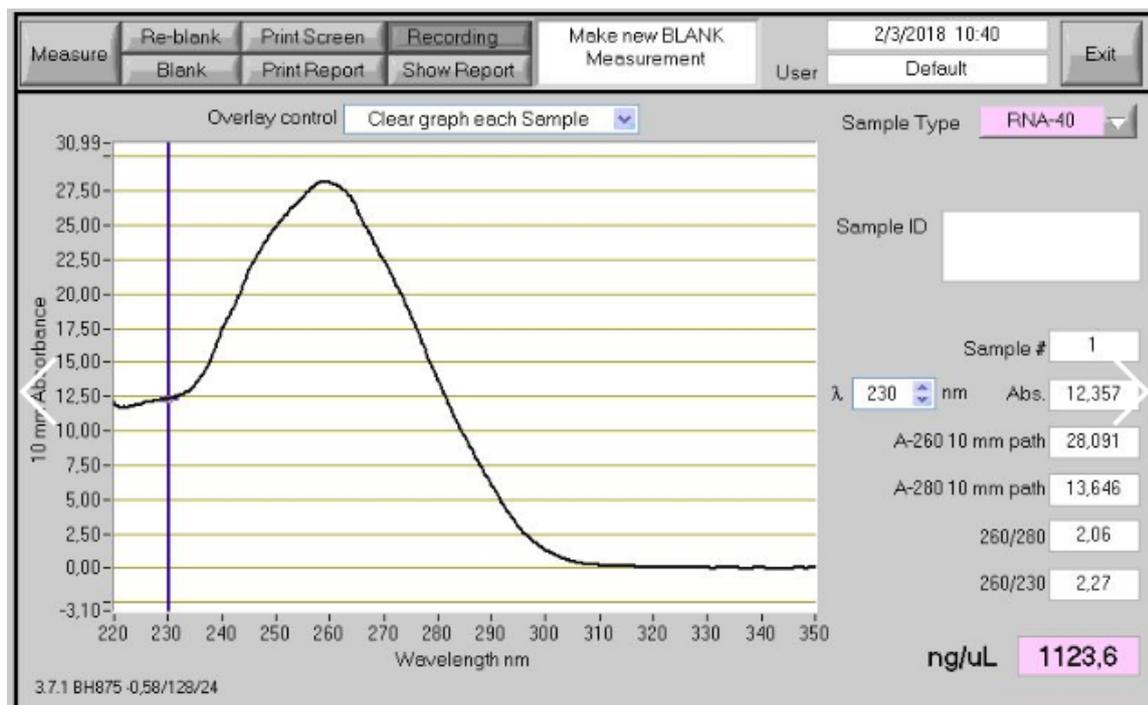


Imagem representativa do espectro de absorção de amostra de C2C12 no equipamento NanoDrop, apresentando boa qualidade e concentração, adequada para ser utilizada na padronização dos *primers*.

Os valores de eficiência foram obtidos a partir da ferramenta *qPCR Efficiency Calculator* (Thermo Fisher Scientific), disponível no site:

<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>>

Gene	Fator de amplificação	Gene	Fator de amplificação
UNG	2,15	XPC	2,09
POLB	2,04	XPA	2,09
BER		NER	
OGG1	1,96	ERCC6	2,06
APEX1	1,97	POLD1	2,05

	Gene	Fator de amplificação		Gene	Fator de amplificação
HR	BRCA1	1,97	NHEJ	XRCC6	1,99
	BRCA2	1,97		XRCC5	1,91
	RAD52	2,00		PRKDC	2,13
	EXO1	1,99		LIG4	2,12

	Gene	Fator de amplificação
Marcadores olfatórios	OMP	2,16
	NGN1	1,98
	RIC8B	1,97
Normalizador	HMBS	2,11