



**RUTE ALVES PEREIRA E COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES MITOCONDRIAIS DE  
CÉLULAS DEFICIENTES NA PROTEÍNA XPC,  
ENVOLVIDA NA VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE  
NUCLEOTÍDEOS (NER)**

**EVALUATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS OF  
XPC PROTEIN DEFICIENT CELLS, INVOLVED IN  
NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (NER) PATHWAY**

***CAMPINAS***

***2013***





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RUTE ALVES PEREIRA E COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES MITOCONDRIAIS DE CÉLULAS DEFICIENTES  
NA PROTEÍNA XPC, ENVOLVIDA NA VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE  
NUCLEOTÍDEOS (NER)**

**Orientadora: Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto**

**Co-orientador: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi**

**EVALUATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS OF XPC PROTEIN  
DEFICIENT CELLS, INVOLVED IN NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (NER)  
PATHWAY**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.*

*Doctorate thesis presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation  
Programme of the School of Medical Sciences of the State University of  
Campinas to obtain the Ph.D. grade in Sciences.*

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Rute Alves Pereira e Costa e orientada pela Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto.

---

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Juliana Ravaschio Franco de Camargo - CRB 8/6631

C823a Costa, Rute Alves Pereira e, 1984-  
Avaliação das funções mitocondriais de células deficientes na proteína XPC, envolvida na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) / Rute Alves Pereira e Costa. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Nadja Cristhina de Souza Pinto.  
Coorientador : Aníbal Eugênio Vercesi.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndrias. 2. DNA mitocondrial. 3. Espécies de oxigênio reativas. I. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de. II. Vercesi, Aníbal Eugênio, 1946-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of mitochondrial functions of XPC protein deficient cells, involved in nucleotide excision repair (NER) pathway

**Palavras-chave em inglês:**

Mitochondria

DNA, Mitochondrial

Reactive oxygen species

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Nadja Cristhina de Souza Pinto [Orientador]

Carlos Frederico Martins Menck

Lucymara Fassarella Agnez Lima

Karina Gottardello Zecchin

Jacqueline Mendonça Lópes de Faria

**Data da defesa:** 06-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RUTE ALVES PEREIRA E COSTA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). NADJA CRISTHINA DE SOUZA PINTO

## MEMBROS:

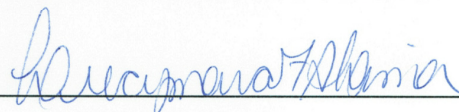
1. PROF(A). DR(A). NADJA CRISTHINA DE SOUZA PINTO



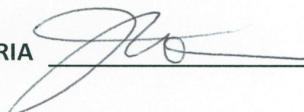
2. PROF(A). DR(A). CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK




3. PROF(A). DR(A). LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA



4. PROF(A).DR(A). JACQUELINE MENDONÇA LÓPES DE FARIA



5. PROF(A).DR(A). KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 06 de dezembro de 2013



O presente trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Genética Mitocondrial, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP/SP), sob a orientação da Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): INCT-Redoxoma (08/57721-3) e projeto temático (10/51906-1).
- Laboratório de Bioenergética situado no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a co-orientação do Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): projetos temáticos (06/59786-0 e 11/50400-0), Auxílio Regular à Pesquisa (09/51948-9) e Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes (08/57952-5).





*Ao Jaime por me ensinar desde a tenra idade que o sucesso não é uma loteria,  
é resultado do esforço diário;*

*À Edna pelo amor incondicional, próprio das mães, e por ter-me dado o bem  
mais valioso que ela possuía;*

*Ao Rafael com quem eu aprendo todos os dias a ser um pouco mais livre;*

*À vida por ter-me dado alguém cujos sonhos são tão grandes quanto os meus, o*

*Jonathan*



À Deus, onde tudo começa, onde tudo termina.

À minha estimada família, meu maior fã clube.

À minha orientadora Professora Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto pela orientação, discussões científicas, delineamentos experimentais, mas acima de tudo pela generosidade em dividir seu conhecimento de forma objetiva, profissional e sempre doce. Sou uma pessoa melhor por a ter conhecido.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pela oportunidade de estar em seu laboratório durante sete anos aprendendo sobre mitocôndria e por me ensinar que todo trabalho sempre pode ser melhor executado afim de se obter um resultado mais preciso.

Ao Professor Dr. Roger F. Castilho pela orientação, discussões científicas e observações sempre pertinentes que me levaram a ser mais crítica e minuciosa no trabalho experimental.

Aos professores membros da banca de qualificação, Dr. Fábio Rogério, Dra. Giovanna Rosa Degasperi, Dra. Kamila Silva e Dra. Márcia Marília Fagian Pansani por avaliar este trabalho e contribuir com várias sugestões para torná-lo melhor.

Aos professores membros da banca de defesa, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Profa. Dra. Lucymara Fassarela Agnez Lima, Profa Dra. Karina Gottardello Zecchin, Dra. Jacqueline Mendonça Lópes de Faria, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato e Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino por terem aceitado o convite e avaliarem este trabalho.

Ao querido amigo Felipe G. Ravagnani pela ajuda na elaboração das perguntas, na busca pelas respostas, pela colaboração técnica e sobretudo pela amizade repleta de bons momentos que guardarei com muito carinho.



Ao Franco A. Rossato pela colaboração técnica e também pela amizade desenvolvida nesses anos. O olhar sempre positivo a respeito de tudo foi, em muitos momentos, a força necessária para não desistir.

Ao Paolo G. La Guardia por ter me acolhido carinhosamente quando cheguei ao laboratório e ter me permitido aprender junto com ele as novidades do mundo científico.

Ao Mateus Prates Mori por dividir o tema desse trabalho comigo, dando enfoque a outros aspectos e por compartilhar comigo muito da sua fé e princípios em conversas inesquecíveis.

A Mariana A. B. Rosales pela ajuda técnica e por ser uma pessoa sempre gentil e agradável.

À Dra. Sonia A. Gurgueira por dividir sua experiência e apontar os atalhos do caminho, além de ter sido um agente facilitador para meus projetos futuros.

Aos amigos que passaram pelo laboratório e já foram embora, Professora Dra. Luciane Carla Alberici, Professora Dra. Mariana Pinheiro Fernandes, Dra. Natália M. Inada Dr. Bruno Alves Paim, Dra. Carina Malaguti Guerra, Dra. Daniela Rodrigues de Melo, Vinícius Vercesi A. N. Ferreira, Carlos E. Benevento e Rose Mara Ortega pela amizade e momentos muito agradáveis.

Aos demais amigos do laboratório, Audrey de Moraes, Ana Carolina Marques, Tiago R. Figueira, Luiz Guilherme M., Juliana A. Ronchi, Juliana Ruas, Raffaella Ignarro, Érika Rodrigues Silva e Sílvia Elaine F. Melo pela convivência diária sempre agradável e contribuições relevantes a este trabalho.

À Edilene de Souza Siqueira Santos, Roberto César Stahl e Elisângela Gomes pelo suporte técnico e auxílio que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

À Márcia M. Fagian Pansani pelo suporte técnico e conselhos sempre pertinentes.

À Camille C. Caldeira da Silva pelo suporte técnico extremamente profissional, eficaz e presente.

À Adriana M. P. Wendel pela ajuda técnica, conselhos, orientações e conversas sempre agradáveis.



À Andressa P. Costa pelo carinho com que sempre tratou a todos e também pelo auxílio técnico sempre presente.

À Dra. Daniela T. Soltys pela colaboração neste trabalho, pelos ensinamentos sobre biologia molecular e pela paciência e prazer em ensinar.

Aos amigos, Carolina Romagna, Carolina Parga, Valquíria Santos, Marlene F. Mendes, Gustavo Carvalho e Paulo Tonolli pela amizade e momentos agradáveis que ajudaram a ampliar meus horizontes pessoais e profissionais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): projetos temáticos (06/59786-0, 11/50400-0 e 10/51906-1), Redoxoma (08/57721-3), Auxílio Regular à Pesquisa (09/51948-9), Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes (08/57952-5), Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o bom desenvolvimento desse trabalho.





*Nenhuma pessoa deve ser encarada como uma abstração. Antes, é preciso enxergar em cada pessoa um universo com seus próprios segredos, com seus próprios tesouros, com suas próprias fontes de angústia e com certa dose de triunfo.*

*ELIE WIESEL*

*The Nazi doctors and the Nuremberg Code*



	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xliii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	47
1.1. Xeroderma pigmentosum .....	49
1.2. Vias de reparo de DNA.....	51
1.3. Reparo por excisão de bases.....	52
1.4. Reparo por excisão de nucleotídeos .....	54
1.4.1. Reparo acoplado à transcrição .....	56
1.4.2. Reparo do genoma global .....	57
1.5. Mitocôndria e estresse oxidativo .....	61
1.6. DNA mitocondrial .....	67
1.7. Biogênese mitocondrial .....	71
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	75
2.1. Objetivo geral .....	77
2.2. Objetivos específicos.....	77
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	79
3.1. Reagentes.....	81
3.2. Meio de reação padrão .....	81
3.3. Cultura de células .....	81
3.4. Medida da atividade da enzima citrato sintase .....	81
3.5. Determinação do número de cópias de DNAMt .....	82
3.6. Medida do consumo de O <sub>2</sub> .....	83
3.7. Medida da atividade da enzima citocromo c oxidase.....	83



3.8. Medida da captação de íons cálcio .....	85
3.9. Análise da produção de radical ânion superóxido.....	85
3.10. Análise da produção de peróxido de hidrogênio .....	85
3.11. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase .....	86
3.12. Medida da atividade da enzima glutathiona peroxidase .....	86
3.13. Análise de dano ao DNA por XL-PCR .....	87
3.14. Isolamento da mitocôndria da célula.....	88
3.15. <i>Western blotting</i> para expressão e localização de XPC .....	89
3.16. Imunofluorescência para expressão e localização de XPC .....	89
3.17. Análise da expressão de genes de biogênese mitocondrial .....	87
3.18. Análises estatísticas .....	90
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
4.1. Atividade enzimática de citrato sintase em células controle e XP-C .....	93
4.2. Número de cópias de DNAMt em células controle e XP-C .....	94
4.3. Consumo de O <sub>2</sub> do complexo I de células controle e XP-C.....	95
4.4. Atividade enzimática de citocromo c oxidase .....	95
4.5. Consumo de O <sub>2</sub> dos complexos II, III e IV de células controle e XP-C .....	98
4.6. Captação de Ca <sup>2+</sup> de células controle e XP-C .....	100
4.7. Produção de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> em células controle e XP-C .....	104
4.8. Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células controle e XP-C .....	105
4.9. Análise das enzimas antioxidantes em células controle e XP-C .....	107
4.10. Análise de lesão ao DNA em células controle e XP-C .....	109
4.11. Atividade enzimática de citrato sintase em células controle e XP-C .....	110
4.12. Número de cópias de DNAMt em células primárias controle e XP-C .....	112
4.13. Localização e expressão da proteína XPC na célula .....	113
4.14. Análise de genes de biogênese mitocondrial em células controle e XP-C imortalizadas e primárias .....	116
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>131</b>



<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>135</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>153</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>161</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AA</b>	Antimicina A
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>ATM</b>	Proteína mutada em Ataxia Telangiectasia
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BER</b>	Reparo por excisão de bases
<b>CDK</b>	Kinase ciclina-dependente
<b>CPDs</b>	Dímeros pirimidina ciclobutano
<b>CS</b>	Proteína Síndrome de Cockaine
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>CTE</b>	Cadeia de transporte de elétrons
<b>CuZnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
$\Delta\psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNAmt</b>	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
<b>DPI</b>	<i>Diphenyleneiodonium</i>
<b>DSRB</b>	Reparo de quebras de dupla fita
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>EGTA</b>	Ácido etileno glicol tetracético
<b>ERCC1</b>	<i>Excisio repair cross complementation</i>
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FCCP</b>	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
<b>FEN1</b>	Endonuclease de flap 1
<b>GGR</b>	Reparo do genoma global
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona, forma reduzida



<b>GSSG</b>	Glutathiona, forma oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HEPES</b>	N-[2hydroxyethyl]piperazine-N'-[2enthanesulfonic acid])
<b>HR</b>	Recombinação homóloga
<b>HRP</b>	Peroxidase de raiz forte VIA
<b>IDLs</b>	<i>Loops</i> de inserção-deleção
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de manganês
<b>MMR</b>	Reparo de emparelhamento errôneo
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato, forma oxidada
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato, forma reduzida
<b>NADK</b>	NAD <sup>+</sup> <i>kinase</i>
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Azida sódica
<b>NBS1</b>	Nijmegen 1
<b>NHEJ</b>	Junção não homóloga de pontas
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health of the United States of America</i>
<b>NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeos
<b>NRF 1 e 2</b>	Fator respiratório nuclear 1 e 2
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical ânion superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	Ânion hidroxila
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b>8-oxo-dG</b>	8-Oxo-2'-deoxiguanosina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCNA</b>	Antígeno celular nuclear de proliferação
<b>6-4PD</b>	Produtos pirimidina-(6,4)-pirimidona
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Receptor peroxissomo proliferador-ativado $\alpha$
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>PTP</b>	Poros de transição de permeabilidade
<b>PDH</b>	Piruvato desidrogenase



<b>RFC</b>	Fator de replicação C
<b>RI</b>	Radiação ionozante
<b>RPA</b>	Proteína de replicação A
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>tRNA</b>	RNA de transferência
<b>RXR</b>	Receptor retinóide x
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SIRT 1</b>	Sirtuína 1
<b>SIRT 3</b>	Sirtuína 3
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>TCR</b>	Reparo acoplado à transcrição
<b>TDG</b>	DNA glicosilase de timina
<b>TFIIH</b>	Fator de transcrição II H
<b>TMPD</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-p-fenilendiamina
<b>TNB</b>	Ácido tionitrobenzóico
<b>TORC1</b>	Coativador transcricional ativado por CREB
<b>TPM</b>	Transição de permeabilidade mitocondrial
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>XP</b>	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
<b>YY1</b>	Proteína repressora transcricional



**PÁG.**

**TABELA 1-** *Primers* utilizados para qPCR para número de cópias de DNAm .....83

**TABELA 2-** *Primers* utilizados para qRT PCR para expressão de genes de biogênese mitocondrial .....88





	<i>PÁG.</i>
<b>ESQUEMA 1</b> – Reparo por excisão de bases (BER) .....	53
<b>ESQUEMA 2</b> – Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) .....	59
<b>ESQUEMA 3</b> – Fosforilação oxidativa, produção de $O_2^{\cdot-}$ e $H_2O_2$ e vias de detoxificação da mitocôndria .....	63
<b>ESQUEMA 4</b> – Redução sequencial de $O_2$ molecular à $H_2O$ em quatro passos de redução monoelétrica .....	64
<b>ESQUEMA 5</b> – Organização do DNAm de mamífero .....	68
<b>FIGURA 1</b> – Atividade de citrato sintase em células controle e XP-C.....	93
<b>FIGURA 2</b> – Número de cópias de DNAm em células controle e XP-C.....	94
<b>FIGURA 3</b> – Taxas de consumo de $O_2$ do complexo I em células controle e XP-C.....	96
<b>FIGURA 4</b> – Atividade de citocromo c oxidase.....	97
<b>FIGURA 5</b> – Taxas de consumo de $O_2$ dos complexos II, III e IV em célula controle e XP-C .....	99
<b>FIGURA 6</b> – Captação de $Ca^{2+}$ em células controle e XP-C .....	102
<b>FIGURA 7</b> – Captação de $Ca^{2+}$ em células controle e XP-C (dobro de células do controle) .....	103
<b>FIGURA 8</b> – Produção de $O_2^{\cdot-}$ .....	105
<b>FIGURA 9</b> – Produção de $H_2O_2$ .....	106
<b>FIGURA 10</b> – Atividade de SOD e GPx.....	108
<b>FIGURA 11</b> – Lesão no DNAm em células primárias controle e XP-C.....	110
<b>FIGURA 12</b> – Atividade de citrato sintase em células primárias controle e XP-C.....	111



<b>FIGURA 13</b> – Número de cópias de DNAmT em células primárias controle e XP-C....	112
<b>FIGURA 14</b> – Expressão e localização da proteína XPC na célula .....	114
<b>FIGURA 15</b> – Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial.....	117



*Resumo*



*Xeroderma Pigmentosum* (XP) é uma doença rara, autossômica recessiva, caracterizada por fotossensibilidade, mudanças pigmentares, envelhecimento precoce da pele e incidência elevada de neoplasias de pele. XP é causada por mutações em, pelo menos oito genes, que caracterizam sete diferentes grupos de complementação genética (XP-A a XP-G) e um tipo variante (XP-V). Mutações em cada um dos genes envolvidos resultam em diferentes graus de severidade da doença, principalmente quanto ao comprometimento neurológico. Pacientes XP-C apresentam mutações no gene *Xpc*, que resultam, geralmente, em proteínas truncadas e instáveis. XPC é uma proteína envolvida na via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) e sua função é reconhecer a lesão na fita de DNA e dar início ao reparo. Recentemente, a participação indireta de XPC no reparo por excisão de bases (BER) foi sugerida, através de sua interação física e funcional com a DNA glicosilase OGG1. Uma vez que OGG1 é essencial para a remoção de purinas oxidadas do DNA mitocondrial, nós hipotetizamos que o DNAm<sub>t</sub>, e conseqüentemente a função mitocondrial, estariam comprometidas em células deficientes em XPC. Desta forma, este trabalho se propôs a investigar alterações bioenergéticas mitocondrias em células obtidas de pacientes XP-C. Nossos resultados revelaram que linhagens celulares XP-C apresentavam menor função mitocondrial, apesar de não apresentarem alterações no número de cópias de DNAm<sub>t</sub>. O consumo de oxigênio pelo complexo I estava significativamente diminuído em células XP-C quando comparado à células controle, enquanto que o consumo de O<sub>2</sub> via os complexos II, III e IV foi maior em células XP-C. A capacidade de captar cálcio também se mostrou alterada nas células XP-C, uma vez que essa célula era incapaz de captar e reter concentrações fisiológicas desse íon. A produção de espécies reativas de oxigênio foi significativamente maior em células XP-C comparadas a células controle. Em acordo, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase foi menor em células XP-C, indicando um desbalanço redox nessas células. A análise da expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial revelou que um regulador transcricional fundamental, o coativador PGC1 $\alpha$ , estava significativamente reduzido em células XP-C transformadas e primárias. Resultados de *Western blotting* e imunofluorescência revelaram que as alterações bioenergéticas e genômicas observadas em células XP-C eram via sinalização e não por efeito direto, uma vez que nas condições





experimentais utilizadas neste trabalho, XPC não está presente na mitocôndria. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que a proteína XPC exerce um papel indireto na manutenção da integridade funcional da mitocôndria, provavelmente através de seu papel no controle da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial.



*Abstract*



*Xeroderma pigmentosum* (XP) is a rare autosomal recessive disorder characterized by photosensitivity, pigmentary changes, premature skin aging and increased incidence of skin cancer. XP is caused by mutations in at least eight genes, which characterize seven different genetic complementation groups (XP-A to XP-G) and variant type (XP-V). Mutations in each gene result in varying degrees of severity, mostly regarding the presence or not of neurodegeneration. XP-C is caused by mutations in the *Xpc* gene, resulting, mostly, in a truncated and unstable protein. The XPC protein is involved in the nucleotide excision repair pathway (NER), where it functions as a damage recognition factor. Recently, a role for XPC in the base excision repair (BER) pathway has been proposed, through its physical and functional interaction with the DNA glycosylase OGG1. Since OGG1 has a major function in repairing oxidized purines in the mitochondrial DNA (mtDNA), we hypothesized that XPC played a role in maintaining mtDNA integrity, and consequently, mitochondrial function. Thus, this study proposes to investigate mitochondrial function in XP-C cell. Our results showed that XP-C cells had less mitochondrial function, although without changes in mtDNA copy number. Oxygen consumption through complex I was lower in XP-C cells compared to control cells, while respiration through complexes II, III and IV was higher in XP-C cells. Calcium uptake and retention by mitochondria was also decreased in XP-C cells, as these cells were unable to retain even physiological spikes in calcium concentration. Reactive oxygen species production was significantly higher in XP-C cells compared to controls. In agreement to that, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase was significantly decreased in XP-C cells, indicating that these cells are under a severe redox signaling imbalance. The analysis of the expression of genes related to mitochondrial biogenesis revealed that the key transcriptional regulator PGC1 $\alpha$  was significantly lower in both transformed and primary XP-C cells. The results of Western blotting and immunofluorescence revealed that the bioenergetic impairment observed in XP-C cells is likely the result of changes in expression and signaling pathways, since, under the experimental conditions used here, XPC is not present in mitochondria. Our results indicate, for the first time, that XPC plays an important role in mitochondrial maintenance, likely via its role in transcription regulation of mitochondrial biogenesis.



## *1. Introdução*





### ***1.1. Xeroderma pigmentosum***

*Xeroderma pigmentosum* (XP) foi descrito pela primeira vez em Vienna por um professor de dermatologia húngaro, Moriz Kaposi em 1870 (Hebra e Kaposi, 1874). A desordem foi inicialmente chamada de xeroderma ou pergaminho da pele e em 1882, o termo pigmentoso foi acrescentado para enfatizar a notável anormalidade pigmentar (Kaposi, 1883). Niesse (1883) descreveu dois irmãos que tiveram XP com degeneração neurológica progressiva começando na segunda década de vida. Em 1932 dois médicos italianos, Carlos Desanctis e Aldo Cacchione descreveram três irmãos com características de XP com degeneração neurológica progressiva começando aos 2 anos de idade, associado à nanismo e desenvolvimento sexual imaturo, a chamada síndrome de Sanctis-Cacchione (Reed et al., 1977). A primeira descrição de XP em um negro africano foi publicada por Loewenthal e Trowell (1938). Em um negro americano, a primeira descrição foi feita por King e Hamilton (1940).

XP é uma doença rara, autossômica recessiva, caracterizada por fotossensibilidade, mudanças pigmentares, envelhecimento precoce da pele e desenvolvimento precoce de neoplasias, principalmente de pele (Cleaver, 1968). Pelo menos sete diferentes grupos de complementação genética já foram descritos (XP-A a XP-G) e um tipo variante (XP-V), resultando em diferentes graus de severidade da doença. Dados epidemiológicos indicam que XP é mais comum no Japão (cerca de 1/22.000) do que nos Estados Unidos (cerca de 1/milhão) (Niedernhofer et al., 2011). Os médicos Chikako Nishigori (Kobe University, Kobe, Japão) e Shinichi Moriwaki (Osaka Medical College, Osaka, Japão) descreveram sua experiência com pacientes XP japoneses. Nos mais de 300 pacientes estudados, cerca de 50% eram XP-A e cerca de 25% eram XP variante (XP-V). Os grupos de complementação C e D representavam somente 11% dos pacientes japoneses. Cerca de 10% dos 300 pacientes estudados, não puderam ser classificados dentro dos grupos de complementação conhecidos (A-G e V) sugerindo que podem haver outros genes não associados ao diagnóstico clínico de XP (Niedernhofer et al., 2011). Em contraste, Kraemer reportou que nos Estados Unidos, dentre os 106 pacientes estudados no *National Institutes of Health (NIH)*, 9% eram XP-A, 6% eram XP-V, 43% eram XP-C e 28% eram XP-D. Do total 5% não puderam ser classificados (Niedernhofer et al., 2011). Os dados obtidos com 80

pacientes XP europeus, foram similares aos dos Estados Unidos, como verificado pelo Dr. Alan Lehmann (University of Sussex, Brighton, UK) com 10% XP-A, 10% XP-V, 20% XP-C, 14% XP-D e 32% não classificados (Niedernhofer et al., 2011).

O diagnóstico da doença dá-se inicialmente muitas vezes por intermédio dos pais, que começam a suspeitar que algo está errado. Eles percebem que, na primeira infância, cerca de 1-2 anos de idade, seus filhos apresentam sardas anormalmente escuras ou queimaduras graves depois de exposição ao sol por apenas alguns minutos. Após essas observações um exame minucioso da pele feito por um dermatologista, juntamente com uma pequena biópsia de pele para testes laboratoriais, é o método padrão para o diagnóstico XP. O diagnóstico conclusivo de XP pode ser realizado através da medida da função de reparo de DNA das células obtidas a partir da biópsia. Os sintomas característicos de XP são:

- Aparecimento de bolhas ou sardas após mínima exposição ao sol ou raios ultravioleta;
- Aparência seca e idade prematura de pele e lábios;
- Fotossensibilidade dos olhos (vermelho e dolorido quando exposto à luz solar);
- Desenvolvimento precoce de câncer de pele nas áreas expostas ao sol, incluindo a ponta da língua;
- Deficiência de desenvolvimento;
- Perda de habilidades neurocognitivas tais como andar e falar.

O tratamento consiste principalmente na proteção contra a exposição à radiação UV e, portanto, na prevenção dos efeitos prejudiciais que estes podem ter sobre a pele. Não há atualmente nenhuma cura para o XP e o prognóstico não é muito favorável, visto que muitos pacientes XP morrem com menos de vinte anos de idade de câncer de pele. No entanto, se uma pessoa é diagnosticada precocemente, não tem sintomas neurológicos graves ou tem uma variante leve, e toma todas as medidas de precaução para evitar a exposição à luz UV, eles podem sobreviver além de meia-idade e ter uma vida relativamente normal. Os pacientes XP e suas famílias enfrentam muitos desafios na vida diária. O constante acesso à informação e os cuidados com a exposição aos raios solares são

fundamentais para lidar com o XP (*Xeroderma Pigmentosum Family Support Group*, [www.xpfamilysupport.org](http://www.xpfamilysupport.org)).

## 1.2. Vias de reparo de DNA

Os genomas de todos os organismos estão constantemente sendo modificados por moléculas reativas que são produzidas endogenamente pela respiração mitocondrial, ou por agentes ambientais, químicos e físicos, que incluem luz ultravioleta (UV), radiação ionizante (RI), metais pesados, poluentes atmosféricos, drogas quimioterápicas e moléculas geradas durante a resposta inflamatória (Lindahl, 1993). Estima-se que são produzidas no genoma humano aproximadamente  $10^5$  lesões ao DNA por dia, como resultado de reações espontâneas, erros de replicação e ação de produtos do metabolismo celular (Hoeijmakers, 2009). Dentre a variedade de lesões formadas, que incluem bases modificadas (volumosas e não-volumosas), sítios abásicos, quebras simples ou duplas das fitas de DNA, *crosslinks* intra e inter-fita e adutos proteína-DNA, aproximadamente  $10^4$  são bases oxidadas e quebras de fita simples do DNA (Lindahl, 1993). O dano persistente ao DNA pode induzir mutagênese, tais como substituição de bases e pequenas inserções/deleções bem como rearranjos cromossômicos. Tal instabilidade genômica é o passo principal para o desenvolvimento de câncer e contribui para o envelhecimento e o surgimento de doenças relacionadas à idade. O dano ao DNA também pode desencadear respostas que culminam na morte celular que são presumidamente a base de patologias que envolvem atrofia de tecidos como a neurodegeneração. A constante manutenção do genoma, portanto, é essencial para a viabilidade e longevidade de um organismo saudável. Desta forma, durante a evolução apenas organismos que desenvolveram múltiplos sistemas de reparo altamente especializados para preservar a integridade do genoma, obtiveram sucesso evolutivo. (Iyama e Wilson, 2013). As principais vias de reparo de DNA encontradas nos organismos vivos são:

- Reparo direto;
- Reparo por excisão de bases (BER);
- Reparo por excisão de nucleotídeos (NER);

- Reparo de emparelhamento errôneo (MMR);
- Reparo de quebra de fita dupla (DSBR) por: Recombinação homóloga (HR) ou Junção não homóloga de pontas (NHEJ).

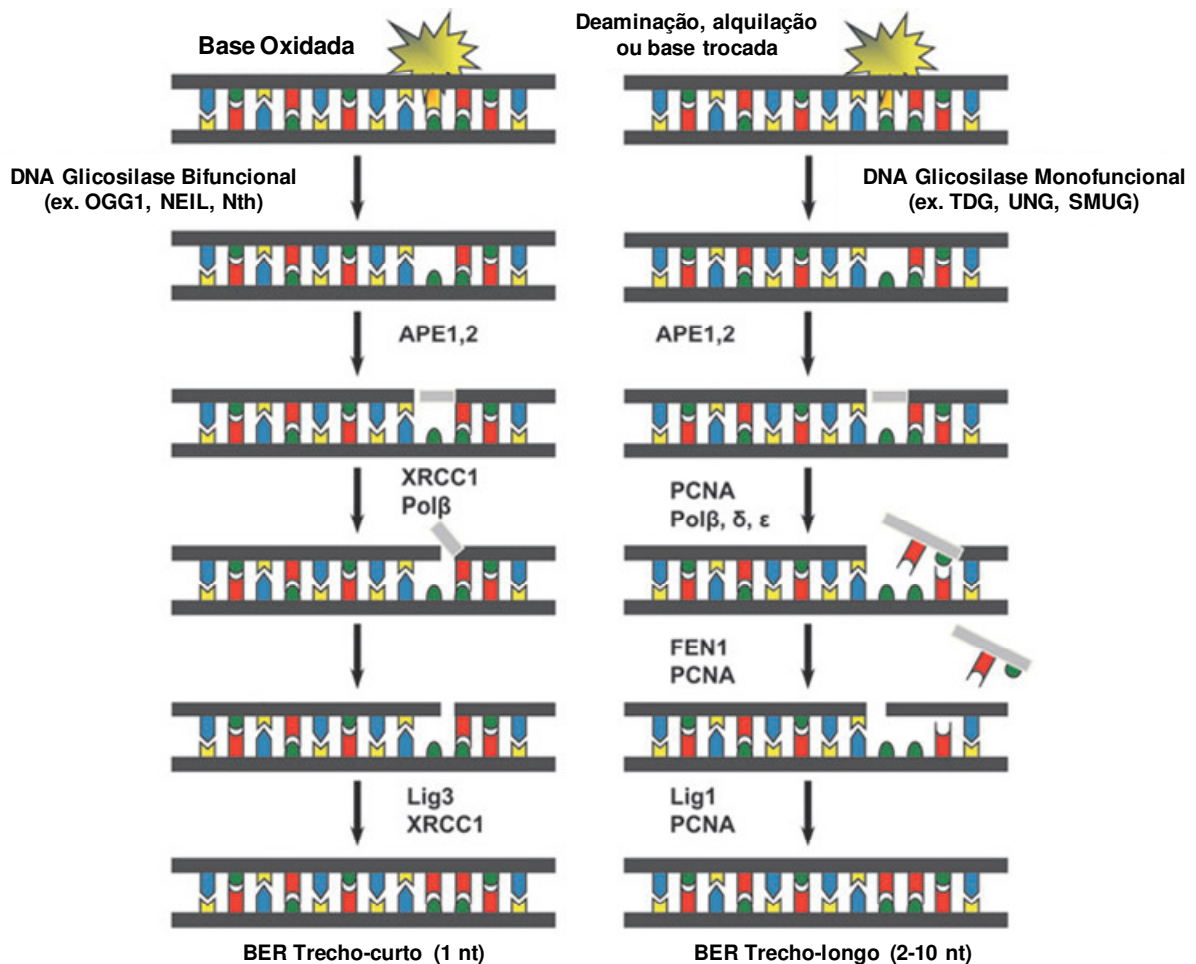
No escopo deste trabalho, discutiremos proteínas classicamente pertencentes às vias BER e NER. Desta forma, as outras vias não serão discutidas em detalhes.

### 1.3. Reparo por excisão de bases (BER)

Bases modificadas de DNA são danos comuns causados por oxidação, desaminação ou alquilação. Há mais de 100 tipos de modificação de bases que podem surgir no DNA, como o resultado do ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são normalmente geradas principalmente pela respiração mitocondrial. Dentre as lesões de base, a 8-oxo-dG (8-Oxo-2'-deoxiguanosina) é uma das mais abundantes e bem caracterizadas (Dizdaroglu et al., 2002). Estima-se que aproximadamente 180 guaninas são oxidadas à 8-oxo-dG por genoma de mamífero por dia. 8-oxo-dG é uma modificação pré-mutagênica potente, porque ela pode parear com a adenina ou citosina durante a replicação e causar mutações transversais G:C para T:A. Modificações de bases, que causam pequena ou nenhuma distorção na dupla hélice do DNA são, comumente reparadas pela via de BER. Dada a ubiquidade das reações de oxidação de base, BER opera em todos os estágios do ciclo celular e recruta várias enzimas e proteínas para: (i) reconhecer e remover a base alterada, (ii) retirar o sítio abásico, (iii) substituir o sítio removido, (iv) processar o terminal gerado e (v) selar a incisão final (Iyama e Wilson, 2013).

Na via de BER, a base lesionada é reconhecida e removida por uma DNA glicosilase lesão-específica. DNAs glicosilases monofuncionais incluem UNG (DNA glicosilase uracil) e MPG (DNA glicosilase N-metilpurina), enquanto DNAs glicosilases bifuncionais são OGG1 (DNA glicosilase 8-oxoguanina), MUTYH (homólogo mutY), NTH1 (endonuclease III-like 1) e NEIL1 (endonuclease VIII-like 1). A DNA glicosilase monofuncional dá origem ao sítio AP (apurínico/apiridimídico) através da remoção da base lesionada. O sítio AP sofre incisão da APE1 (AP endonuclease 1), gerando uma quebra de fita. A enzima Pol  $\beta$  remove metade da quebra de fita pela atividade intrínseca de uma liase. Uma DNA glicosilase bifuncional retira a base lesionada. No trecho-curto, Pol  $\beta$  recoloca o

nucleotídeo ausente e o complexo XRCC1-LIG3 $\alpha$  sela a incisão; no trecho-longo Pol $\delta/\epsilon$ , RFC e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) incorporam de 2 a 13 nucleotídeos para então FEN1-LIG1 (endonuclease de flap 1) completar o processo de reparo. (Wilson et al., 2011; Sykora et al., 2012). O **esquema 1** apresenta os principais passos enzimáticos da via de BER.



**Esquema 1. Reparo por excisão de bases (BER).** A figura mostra um modelo geral das subvias de trecho-curto (esquerda) e do trecho-longo (direita) da via de BER. Na subvia de trecho-curto, apenas um único nucleotídeo é substituído, enquanto que na subvia de trecho-longo, entre 2 a 10 novos nucleotídeos são adicionados. Adaptado de Melis et al., (2013).

Dada a ubiquidade das lesões reparadas por essa via e sua importância na manutenção da integridade genômica, existem poucas doenças hereditárias associadas com um defeito genético em componentes clássicos da via de BER. Essas desordens envolvem predisposição ao desenvolvimento de câncer (câncer colorretal, Cheadle e Sampson 2007), defeitos imunológicos (DNA glicosilase UNG e a síndrome hiper-IgM V, Imai et al., 2003) e anormalidades neurológicas. O fato de homozigotos *knockout* para proteínas centrais da via de BER levarem à letalidade embrionária ou pós-nascimento, ressalta a natureza frequente de dano endógeno ao DNA e sugere que a completa eliminação desta via de reparo é incompatível com a vida. Algumas associações entre a capacidade reduzida de BER e neuropatologias como Alzheimer tem sido reportadas (Iida et al., 2002; Mao et al., 2007; Weissman et al., 2007; Gredilla et al., 2012). Além disso, há evidências emergentes de que defeitos em BER aumentam a susceptibilidade a complicações em derrames, provavelmente devido ao estresse oxidativo agudo (Endres et al., 2004; McNeill et al., 2011; Liu et al., 2011).

#### **1.4. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)**

Diferentemente do que ocorre no reparo por excisão de bases, as enzimas de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) não reconhecem uma lesão em particular, ao invés disso, o sistema utiliza o reconhecimento de distorções na dupla hélice, como as distorções causadas por dímeros de timina ou pela presença de um aduto químico volumoso sobre uma base. Essas distorções desencadeiam uma série de eventos que levam à remoção do pequeno segmento de fita simples que inclui a lesão. Essa remoção origina uma lacuna de fita simples no DNA, que é preenchida pela DNA-polimerase, utilizando a fita não danificada como molde e restaurando a sequência nucleotídica original. O reparo por excisão de nucleotídeos em *E. coli* é realizado basicamente por quatro proteínas: UvrA, UvrB, UvrC e UvrD. Um complexo de UvrA e UvrB verifica o DNA; a proteína UvrA é a responsável pela detecção de distorções na hélice. Após encontrar uma distorção, a UvrA sai do complexo. UvrB é uma ATPase que, após a liberação de UvrA recruta a

endonuclease UvrC e esta promove duas incisões: uma localizada a oito nucleotídeos de distância na direção 5´da lesão, e a outra a quatro ou cinco nucleotídeos de distância na direção 3´da lesão. Essas clivagens produzem um segmento de DNA de fita simples de cerca de 12 a 13 nucleotídeos de comprimento, que se torna acessível pela ação da DNA-helicase (UvrD). Finalmente, a DNA-polimerase (Pol I) e a DNA-ligase preenchem e selam a lacuna resultante (Croteau et al., 2008)

O princípio do reparo por excisão de nucleotídeos em eucariotos é análogo ao de *E. coli*, mas a maquinaria para a detecção, excisão e reparo da lesão é mais complexa, envolvendo 30 proteínas ou mais. É a mais versátil e flexível via de reparo de DNA em células eucarióticas, por reconhecer uma vasta gama de lesões de DNA estruturalmente distintas (Andressoo et al., 2005). NER atua na remoção de lesões que distorcem a dupla hélice de DNA, interferem no pareamento de bases e bloqueiam a replicação e a transcrição de DNA. As lesões reconhecidas pela via de NER podem surgir em decorrência da exposição a vários agentes nocivos. A radiação UV produz dímeros pirimidina ciclobutano (CPDs) e produtos pirimidina-(6,4)-pirimidona (6-4PP) que são substratos clássicos dessa via. A exposição a vários agentes químicos ou alquilantes, também podem resultar na formação de adutos volumosos, como por exemplo, hidrocarbonos policíclicos aromáticos, presentes na fumaça do cigarro. Recentemente, contudo, foi demonstrado que NER também remove lesões oxidadas de DNA como adutos cíclicos de purina (Andressoo et al., 2005).

A via de NER consiste em duas subvias, as quais mecanisticamente tem início de maneira diferente, mas após o reconhecimento do dano, seguem a mesma rota molecular. As subvias são: reparo acoplado à transcrição (TCR) e reparo do genoma global (GGR). A subvia TCR é responsável por remover lesões presentes na fita codificante (transcrita) de genes ativos (Iyama e Wilson, 2013). Esse mecanismo de reparo cuida de lesões que estejam bloqueando a maquinaria de transcrição. A GGR reconhece e remove lesões ao longo de todo o genoma e é considerada relativamente lenta e um pouco menos eficiente, uma vez que deve scanear todo o genoma em busca de dano ao DNA (Iyama e Wilson, 2013). Ambas as subvias podem ser divididas em quatro fases: (i) reconhecimento do dano ao DNA, (ii) recrutamento do complexo de pré-incisão e desenrolamento do DNA, (iii)

criação de dois flancos de incisão no local lesionado e subsequente excisão desse fragmento e (iv) síntese do DNA reparado e ligação (Diderich et al., 2011).

#### **1.4.1. Reparo acoplado à transcrição (TCR): CSA, CSB e XPG**

O reparo acoplado à transcrição (TCR) é uma das subvias da via de NER que, exceto pela fase inicial de reconhecimento da lesão, segue a mesma via molecular do reparo do genoma global (GGR). Apesar de não ser ainda totalmente entendido mecanisticamente, o modelo proposto de funcionamento da TCR indica que é o bloqueio do complexo de alongamento da RNA polimerase (RNAPII) no local da lesão em fitas transcritas de genes ativos que funciona como reconhecimento da lesão. Este bloqueio da RNA polimerase, serve como sinal, por mecanismos não conhecidos, para o recrutamento de proteínas da Síndrome de Cockayne (CS), CSA e CSB, as quais facilitam a remoção do complexo RNAPII para o acesso da maquinaria de reparo. Além disso, CSA e CSB auxiliam no recrutamento das proteínas de reparo subsequentes, incluindo o complexo TFIIH (fator de transcrição II H). Após esta etapa, a mesma maquinaria proteica envolvida na GGR é, presumivelmente, recrutada para incisão, excisão do fragmento lesionado, preenchimento da lacuna e ligação da incisão. Assim como a GGR, TCR parece funcionar independente do ciclo celular (Iyama e Wilson, 2013).

Como já citado no parágrafo anterior, as proteínas CS desempenham um papel fundamental na TCR. Esta conclusão é baseada em vários dados biológicos e bioquímicos, como, por exemplo, os experimentos de imunoprecipitação da cromatina, que mostraram que CSB interage fortemente com o complexo cromatina-RNAPII (Fousteri et al., 2006). Neste trabalho, a radiação UV aumentou a associação entre essas duas proteínas, possivelmente, em decorrência de uma resposta cooperativa devido ao dano induzido ao DNA (Fousteri et al., 2006). Outro estudo mostrou que a imunoprecipitação de extrato celular total de células CS1AN, oriundas de pacientes CSB, transformadas com SV40 complementadas com HA-CSB detectou um complexo estável de CSB com a RNAPII (van Gool et al., 1997). Estudos de filtração de gel usando células CS1AN ou HeLa que



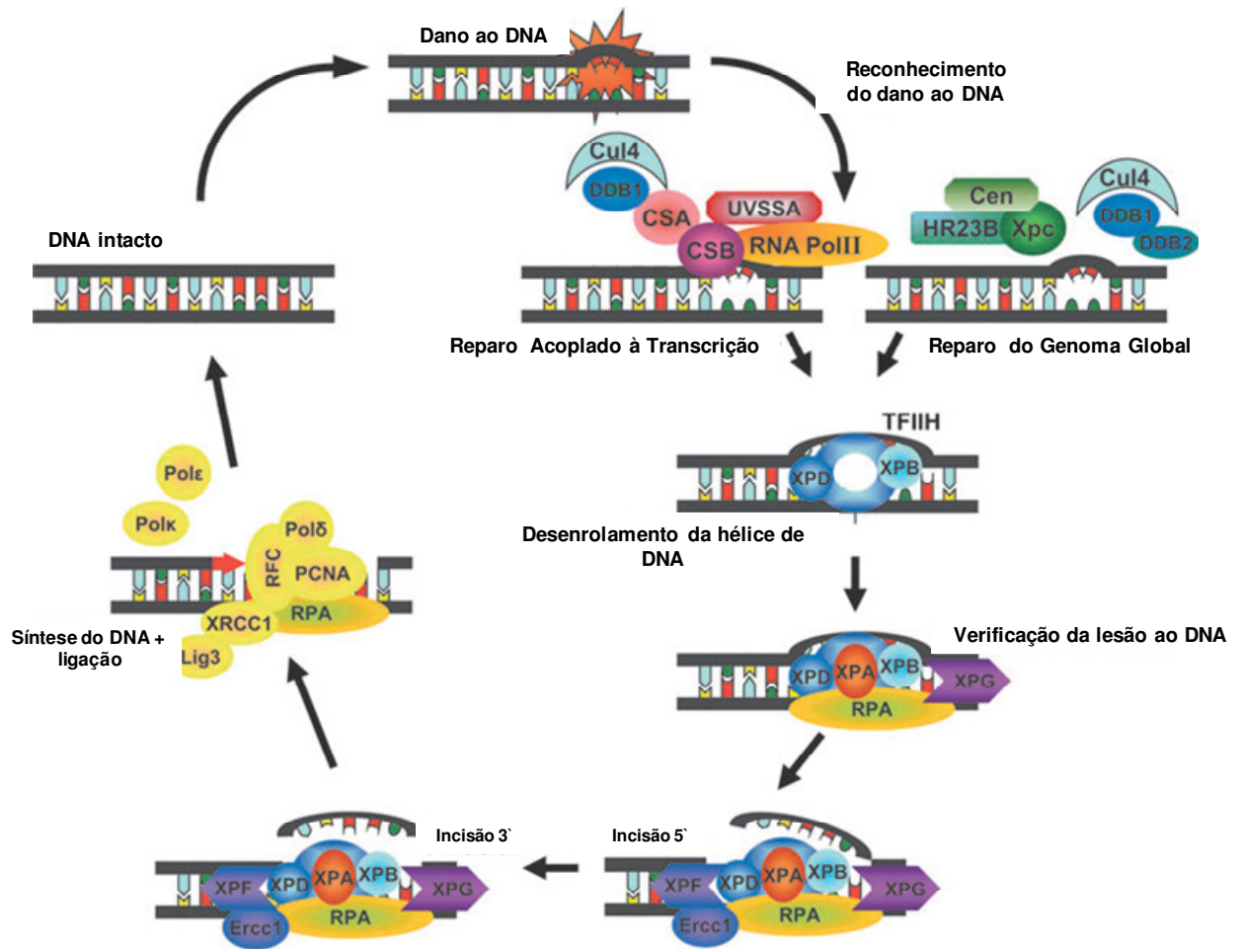
expressavam CSB, sugerem que CSB e RNAPII, formam complexos protéicos de alto peso molecular estáveis (van Gool et al., 1997). Por fim, experimentos cinéticos em células vivas usando a técnica de fotodegradação, demonstraram que, transitoriamente, CSB interage com a maquinaria de transcrição (van den Boom et al., 2004). É importante considerar que a associação CSB à RNAPII é responsável pelo recrutamento de vários fatores de NER necessários.

#### **1.4.2. Reparo do genoma global (GGR): XPC e XPA**

O reparo do genoma global (GGR), como o próprio nome sugere, remove distorções da hélice, localizadas em regiões não ativamente transcritas do genoma, provavelmente de uma maneira independente do ciclo celular (Fagbemi et al., 2011). O complexo XPC-HR23B inicia a resposta de reparo pelo reconhecimento da mudança estrutural induzida pelo dano ao DNA, ligando-se à fita oposta à lesão e não ao aduto químico (Min e Pavletich, 2007; Maillard et al., 2007; Scharer, 2007). Uma vez ligado, o complexo XPC-HR23B media o recrutamento do complexo fator de transcrição II H (TFIIH), que contém dez subunidades, incluindo duas helicases XPB (3'-5') (Coin et al., 2007) e o XPD (5'-3') (Sugasawa et al., 2009; Mathieu et al., 2010). Através da atividade dessas sub-unidades, TFIIH promove a abertura do duplex de DNA em volta da lesão, criando uma bolha para o recrutamento de XPA e da proteína de replicação A (RPA) e também do conjunto do complexo de pré-incisão. XPA promove a liberação de TFIIH, da cinase ciclina-dependente (CDK), ativação do sub-complexo (CAK) (Coin et al., 2008) e a associação de RPA com a fita de DNA lesionada (Missura et al., 2001; Camenisch et al., 2006). A dissociação de CAK, visa facilitar o recrutamento das endonucleases XPF, ERCC1 e XPG, bem como a liberação do complexo XPC-HR23B.

O complexo XPF-ERCC1 é recrutado para a lesão via interação direta com XPA (Tsodikov et al., 2007; Orelli et al., 2010), enquanto XPG é recrutado via interação com TFIIH e estabilização do complexo pré-incisão (Evans et al., 1997). As duas endonucleases, XPF-ERCC1 e XPG, são responsáveis pela incisão 5' e 3', respectivamente ao DNA

lesionado. Depois da dupla incisão e remoção do fragmento lesionado, as DNAs polimerases  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\kappa$ , preenchem a lacuna em conjunto com o fator de replicação C (RFC) e o antígeno celular nuclear de proliferação (PCNA) (Mocquet et al., 2008; Ogi et al., 2010). Por fim, a incisão é selada pelo XRCC1-DNA Ligase III (LIG3) ou pelo (FEN1)-DNA ligase I (LIG1) (Araújo et al., 2000; Mocquet et al., 2008), ou pela XRCC1-LIG3 $\alpha$  em células que não se dividem (Moser et al., 2007). O **esquema 2** apresenta uma representação dos passos moleculares envolvidos nas duas subvias de NER.



**Esquema 2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER).** A lesão no DNA pode ser reconhecida por um de dois mecanismos: o bloqueio do complexo de elongação da RNAPII, juntamente com os fatores CSA e CSB, na subvia de TCR; ou pelo complexo XPC/HR23B, na subvia GGR de NER. Depois do reconhecimento do dano ao DNA, a rota de reparo progride ao longo da mesma via molecular. Depois do desenrolamento do DNA e a verificação do dano, incisões são feitas para remover o fragmento lesionado de DNA. Ao final da via, a síntese de DNA e subsequente ligação, reproduz a sequência correta de DNA. Adaptado de Melis et al., (2013).

A GGR está envolvida no reconhecimento de várias lesões que levam a distorções no DNA. Estudos *in vivo* com camundongos deficientes em *Xpc*, com *background* genético misto (75% C57Bl/6J, 25% 129) mostraram um grande aumento na incidência de tumor pulmonar comparado ao controle. Uma possível explicação para tal fenótipo, pode ser a contínua exposição à oxidantes e subsequente formação de dano oxidativo ao DNA no tecido pulmonar (Hollander et al., 2005). Outro estudo revelou que 100% dos camundongos *Xpc*<sup>-/-</sup>, no momento da morte e no intervalo de 16-17 meses, abrigavam tumores pulmonares. Ao contrário, camundongos deficientes em *Xpa*, espontaneamente apresentavam um aumento significativo na incidência de tumor do fígado, mas não de pulmão (Melis et al., 2008). Além disso, um elevado nível de mutações foi encontrado no tecido pulmonar de camundongos *Xpc*<sup>-/-</sup> durante o envelhecimento, o que correlaciona com deficiência de reparo de lesões oxidativas no DNA nesses modelos (Melis et al., 2008). Uma vez que não há incidência de tumor pulmonar em camundongos deficientes em *Xpa*, esses resultados apontam para uma função adicional de XPC em resposta ao dano oxidativo no DNA.

Vários estudos *in vitro* usando fibroblastos, mostram que células derivadas de camundongo deficiente em *Xpc*, eram mais sensíveis (sobrevivência e acúmulo de lesão) à exposição ao oxigênio do que células derivadas de camundongo deficiente em *Xpa* ou selvagem (Melis et al., 2008). Estudos usando queratinócitos primários humanos e fibroblastos de pacientes XP-C, mostraram que XPC protege a pele humana do efeito destrutivo de oxidantes tais como bromato de potássio ou aqueles induzidos por raios-X. O mesmo estudo, revelou que XPC está envolvida no reparo de 8-oxo-Gua, a mais abundante base oxidada do DNA através de sua interação física e funcional com a DNA glicosilase OGG1 (D'Errico et al., 2006). Outro estudo também usando queratinócitos humanos normais, mostrou que a diminuição da expressão de XPC resultou em aumento de EROs intracelulares, oxidação de DNA genômico e mitocondrial e alterações no metabolismo (Rezvani et al., 2011). Neste trabalho, os autores propuseram que as alterações metabólicas provocadas pela diminuição da concentração de XPC decorrem de uma mudança metabólica, mas não expandem sobre o mecanismo molecular que causa essa mudança.

O trabalho de D'Errico et al., 2006, postulou que o complexo XPC-HR23B age como co-fator na subvia de trecho-curto de BER, estimulando a atividade de OGG1. Outra observação propôs que XPC também interage com a DNA glicosilase timina (TDG), amparando a hipótese de que XPC também pode estar envolvida na subvia de trecho-longo de BER (Shimizu et al., 2003). XPC parece não ser essencial à via de BER, mas pode modular sua atividade.

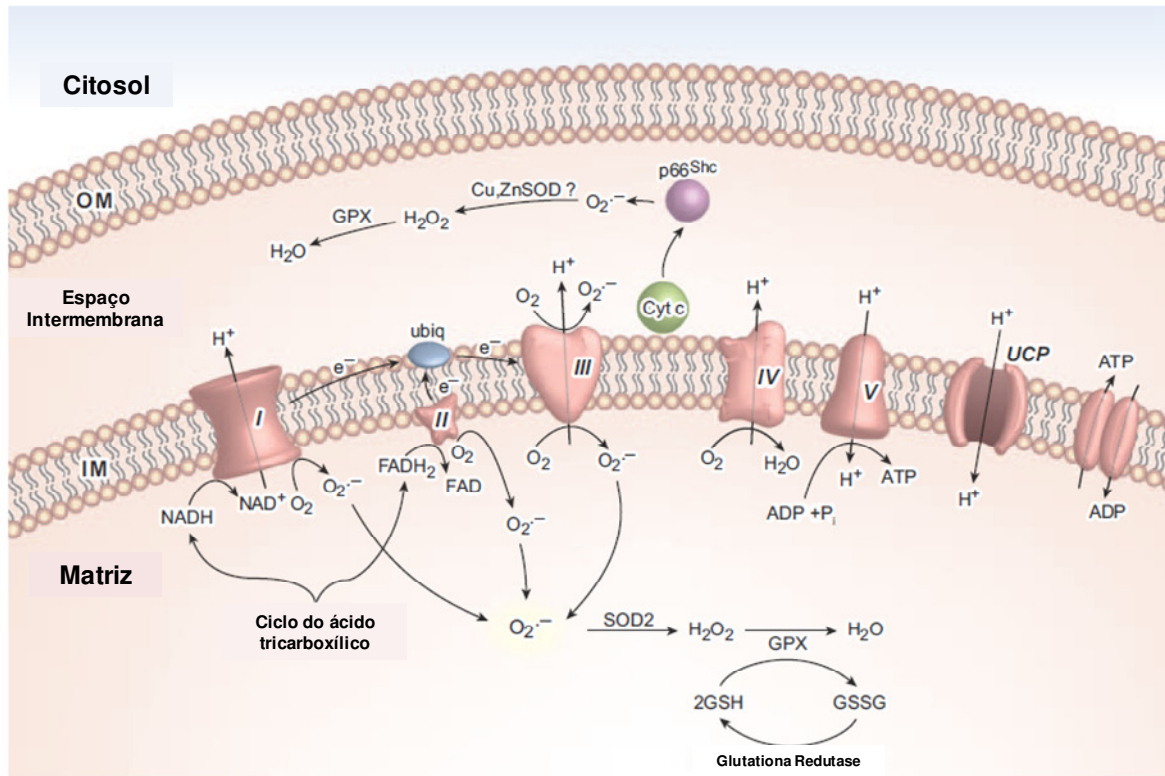
### **1.5. Mitocôndria e estresse oxidativo**

As mitocôndrias são organelas cuja principal função é a produção de ATP através da fosforilação oxidativa. As mitocôndrias possuem duas membranas compostas por bicamadas lipoprotéicas: uma externa e uma interna, sendo que a membrana interna apresenta uma superfície maior, impermeável a quase todas as moléculas e contém as enzimas responsáveis pela fosforilação oxidativa. Para a formação do ATP mitocondrial, ocorre passagem de elétrons, derivados predominantemente de intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (também chamado de Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo de Krebs), por um complexo multienzimático denominado cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Fariss et al., 2005).

Acoplados à passagem de elétrons, prótons são bombeados através dos complexos I (NADH desidrogenase), III (complexo citocromo bc1) e IV (citocromo c oxidase) para o espaço intermembranas, criando um potencial eletroquímico. Esse potencial é a força protomotora ( $\Delta p$ ), composta de um gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) e de um potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta \Psi_m$ ), que impulsiona a enzima ATP sintase a fosforilar o ADP, gerando ATP, quando do retorno dos prótons à matriz mitocondrial. O ATP sintetizado dentro da matriz mitocondrial é então exportado para o citoplasma através de um translocador de nucleotídeos de adenina, também conhecido por translocador ATP/ADP. O acceptor final dos elétrons da CTE é o oxigênio molecular ( $O_2$ ), que é reduzido à água em quatro passos de transferência monoelétrica no sítio ativo do complexo IV. Durante a transferência de elétrons através da CTE, elétrons podem escapar do caminho canônico, resultando em uma

redução monoelétrica do oxigênio molecular, fora do complexo IV, levando à formação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Esta espécie é rapidamente dismutada pela enzima superóxido dismutase (SOD) levando à formação de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  pode ser metabolizado a  $H_2O$  e  $O_2$  que utiliza elétrons provenientes de glutatona reduzida como poder redutor. Entretanto, quando na presença do íon ferroso ou de outros metais bivalentes, através de reação de Fenton ou do tipo Fenton, o  $H_2O_2$  pode sofrer cisão homolítica, o que resulta na formação de radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) altamente reativos (Halliwell e Gutteridge, 1997).

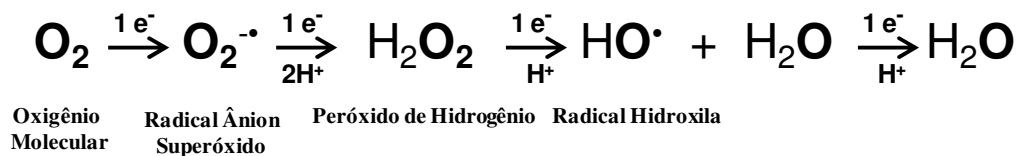
O  $H_2O_2$  é uma espécie química permeável através de membranas e mais estável, podendo ser removida por diferentes enzimas com atividade de peroxidase. Estima-se, embora haja controvérsias sobre o valor, que cerca de 1% de todo o oxigênio consumido pelas mitocôndrias resulta na formação de EROs (Harper et al., 2004; Fariss et al., 2005; O'Rourke, 2005; Figueira et al., 2013). Uma vez que a capacidade antioxidante mitocondrial seja sobrecarregada pela presença dessas espécies reativas, dano oxidativo e morte celular podem ocorrer (Fariss et al., 2005; O'Rourke, 2005).



**Esquema 3. Fosforilação oxidativa, produção de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  e vias de detoxificação da mitocôndria.** Elétrons ( $e^-$ ) do NADH e  $FADH_2$  passam através dos complexos I e II respectivamente e depois são levados ao complexo III via ubiquinol. Citocromo c oxidase transfere elétrons do complexo III para o complexo IV, o qual reduz o  $O_2$  à  $H_2O$ . A passagem de elétrons é acompanhada por uma ejeção de prótons ( $H^+$ ) através da membrana mitocondrial interna pelos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico,  $\Delta\psi$ . Os prótons entram novamente na matriz mitocondrial através do complexo V, o qual usa a força protomotora para gerar ATP. A força protomotora também leva à troca ATP-ADP pela ANT. UCPs permitem o retorno de elétrons à matriz mitocondrial, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio. Do complexo I, vazam elétrons que levam à formação de  $O_2^{\cdot-}$  para a matriz, ao passo que o complexo III gera  $O_2^{\cdot-}$  tanto para a matriz quanto para o espaço intermembrana.  $P66^{Shc}$  é o substrato de elétron do espaço intermembrana oriundo do citocromo c que produz  $O_2^{\cdot-}$ . O superóxido é desmutado à  $H_2O_2$  pela Cu e ZnSOD no espaço intermembrana e pela SOD2 na matriz.  $H_2O_2$  é reduzido à  $H_2O$  pela glutaciona peroxidase (GPx) usando GSH e a glutaciona oxidada resultante (GSSG) é reduzida de volta à GSH pela glutaciona redutase. Pi – fosfato inorgânico. Adaptado de Madamanchi e Runge, 2007.

Entende-se por radical livre qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desapareados ou que contenha um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. A presença de elétrons desapareados na última camada eletrônica confere a essas espécies, na maior parte dos casos, grande reatividade e uma meia-vida curta variando de nano a microssegundos (Simm e Brömme, 2005, Cerqueira et al., 2006). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está fortemente relacionado com seu sítio de formação (Bianchi e Antunes, 1999).

EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O<sub>2</sub> sofre redução tetravalente, com o recebimento de quatro elétrons, resultando na formação de H<sub>2</sub>O. Durante esse processo podem ser formados intermediários reativos, como os radicais ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), hidroperóxido (HO<sub>2</sub><sup>-•</sup>) e ânion ou radical hidroxila (OH<sup>-</sup> ou OH<sup>•</sup>). Normalmente, a redução completa do O<sub>2</sub> ocorre no sítio ativo do complexo IV, Citocromo c Oxidase, sem a liberação de intermediários de redução. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é um radical livre, pois não possui elétrons desapareados na sua última camada eletrônica, embora seja um metabólito extremamente deletério porque participa da reação que produz o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Ferreira e Matsubara, 1997), bem como é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos em sítios mais distantes de seu local de formação (Bianchi e Antunes, 1999).



**Esquema 4. Redução sequencial do oxigênio molecular à água em quatro passos de redução monoelétrica.** A adição de um elétron ao oxigênio produz o radical ânion superóxido. Se o superóxido é reduzido por outro elétron, então, peróxido de hidrogênio é produzido. O peróxido de hidrogênio pode aceitar outro elétron e esse passo ocorre naturalmente como resultado da transferência de elétrons na presença de metal bivalente, em reações do tipo Fenton (normalmente com cobre ou ferro). Quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aceita o elétron doado, ele é convertido ao radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) e ânion hidroxila (HO<sup>-</sup>) que, quando combinados com hidrogênio, produzem água. Adaptado de Koop, (2004).



A vida em aerobiose caracteriza-se pela contínua produção de EROs, sendo contrabalanceada pelo consumo de defesas antioxidantes não-enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Dessa maneira, em condições fisiológicas, o balanço entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém em equilíbrio. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo encontra-se em desbalanço redox ou sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (Belló-Klein, 2002).

As EROs desempenham vários papéis importantes no controle de diversas funções fisiológicas como sinalizadores centrais no controle do tônus vascular, sinalização intracelular e resposta imune fagocitária (Dröge, 2001; Belló-Klein, 2002; Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002). Entretanto, essas espécies também podem desempenhar um papel causal importante no desenvolvimento de várias doenças, tais como aterosclerose, diabetes, infecção por HPV, injúria de isquemia-reperfusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, catarata, enfisema, dentre outras (Belló-Klein, 2002). Em todas elas, a injúria inicial (isquemia, trauma, toxinas, radiação, infecção, etc) determina alterações intracelulares, como recrutamento de macrófagos, dano mitocondrial, alterações nas defesas antioxidantes e aumento do cálcio intracelular. Essas alterações geram estresse oxidativo, levando o organismo a três possíveis respostas celulares: 1) adaptação, por aumento na atividade dos sistemas antioxidantes, que pode gerar proteção da célula contra danos oxidativos futuros; 2) dano tecidual por lesão a lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos ou 3) morte celular, seja por necrose ou apoptose (Belló-Klein, 2002).

A morte celular pode decorrer de um evento chave envolvido nesse processo, chamado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM é um evento dependente do aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial, que leva à perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), inchamento mitocondrial e ruptura da membrana externa das mitocôndrias, após a abertura de um canal conhecido como poro de transição de permeabilidade (PTP), cuja composição proteica ainda é controversa na literatura. Tem sido sugerida a participação de proteínas da matriz e de proteínas das membranas mitocondriais interna e externa na composição do poro de transição. Os componentes mais citados são os canais de ânions voltagem-dependentes (VDACs), o translocador de nucleotídeos de

adenina (ANT) e ciclofilina D (CyP D), dentre outras moléculas (Tsujiimoto e Shimizu, 2007; Lemasters et al., 2009). Trabalho recente do próprio laboratório (Ronchi et al., 2011) demonstrou, em mitoplastos, que são mitocôndrias isoladas desprovidas de membrana externa, que nem todas essas proteínas são componentes essenciais do poro de transição.

Em 1976, Hunter e colaboradores trataram mitocôndrias isoladas com  $\text{Ca}^{2+}$  e propuseram que o acúmulo mitocondrial deste cátion resultava na permeabilização da organela devido à formação de um poro na membrana interna. Devido ao fato desse processo ser parcialmente revertido através da remoção do  $\text{Ca}^{2+}$ , esse fenômeno foi denominado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Hunter e Haworth, 1979). Segundo esse trabalho, o cálcio induz alterações na homeostasia mitocondrial, induzindo o desacoplamento da fosforilação oxidativa, em associação ao inchamento da organela. Posteriormente, demonstrou-se que quantidades excessivas de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias isoladas induziam uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, mediada por estresse oxidativo e acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial (Kowaltowski et al., 2001). Alterações em grupos de proteínas da membrana mitocondrial interna levariam à formação do PTP mitocondrial, com a formação de agregados devido a alterações estruturais (He e Lemasters, 2002). O aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e produção de espécies reativas de oxigênio induziriam a oxidação de resíduos de cisteína e permitiriam a formação de ligações cruzadas S-S (Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1996), levando à uma permeabilização não-específica da membrana mitocondrial interna (Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2001).

Alterações no transporte de íons podem ocorrer devido a modificações em lipídeos e proteínas de membranas, com aumento nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dawson e Dawson, 1996). A distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é controlada por processos de transporte desse cátion através da membrana plasmática e de membranas de várias organelas ou regiões celulares, como o retículo endoplasmático liso, o núcleo e a mitocôndria (Carafoli, 1987; Gunter e Gunter, 1994). Em 2010, Perocchi e colaboradores mostraram a primeira evidência do gene que codifica o transportador de cálcio mitocondrial (MICU1, de *mitochondrial calcium uptake 1*), através de experimentos com RNA de interferência para

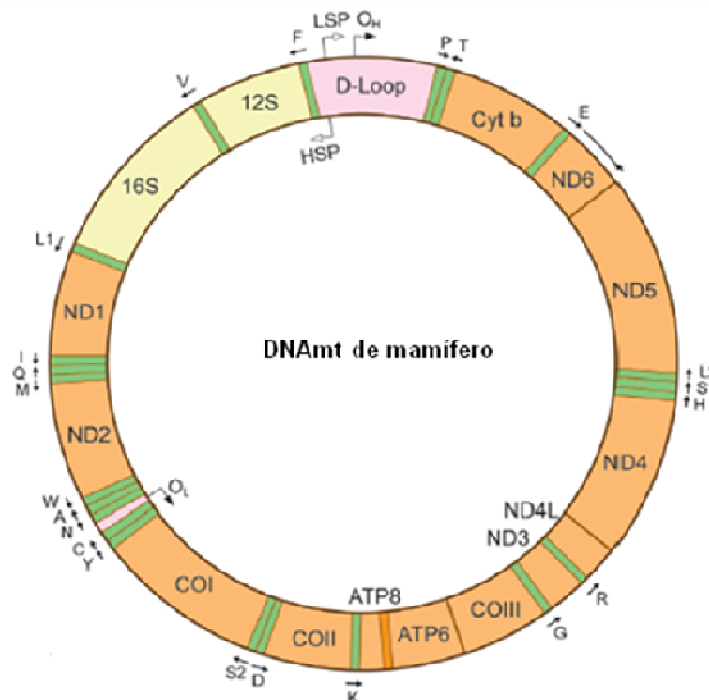
os RNAs mensageiros de 13 genes candidatos que são conservados em eucariotos e cinetoplastídeos, porém ausentes em *S. cerevisiae*. Para este estudo, foram empregados dados prévios de fisiologia comparativa, genômica evolucionária e proteômica de organelas (Perocchi et al., 2010; Collins e Meyer, 2010). Em eucariotos, as concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  oscilam em torno de 1 a 2 mM e as concentrações intracelulares em torno de 50 a 100 nM (Carafoli, 1987).

Recentemente Vaseva e colaboradores (2012) mostraram em condições de estresse que a proteína p53 é capaz de migrar para a matriz mitocondrial e formar um complexo com a ciclofilina D (reguladora do poro de transição de permeabilidade), mas não com VDAC ou com o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) e está relacionada à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A formação do complexo Cyp-p53 é capaz de induzir a abertura do PTP mitocondrial. Mais recentemente, Giorgio e colaboradores (2013) mostraram que dímeros purificados de ATP sintase e reconstituídos em bicamadas lipídicas podem ter a função semelhante ao poro de transição de permeabilidade (PTP), com mudanças nos padrões eletrofisiológicos capazes de induzir a abertura de um canal equivalente ao PTP. Além disso, esses autores mostraram interação da Cyp D com a ATP sintase na regulação desse poro. Todos esses resultados mostram um papel duplo para a ATP sintase: síntese de ATP e controle da transição de permeabilidade mitocondrial (Giorgio et al., 2013; Bernardi, 2013).

## **1.6. DNA mitocondrial**

Em eucariotos não fotossintetizantes, a mitocôndria é a única organela intracelular que possui o seu próprio genoma. O DNA mitocondrial (DNAMt) humano é uma molécula circular de 16569 pares de bases, localizada na membrana mitocondrial interna. A maioria das células possui centenas de mitocôndrias e cada mitocôndria contém entre 5 a 10 cópias de DNAMt (Wallace, 1999). O DNAMt contém 13 genes que codificam para polipeptídeos essenciais à fosforilação oxidativa, 12S e 16S RNA ribossômicos (rRNA) e 22 RNAs de

transferência (tRNA) necessários para síntese proteica na mitocôndria. Uma vez que o DNAm<sub>t</sub> encontra-se fisicamente associado à membrana mitocondrial interna, próximo do local onde as EROs são geradas, ele é um alvo constante de danos provocados por essas espécies (Clayton et al., 1974; Yakes e Van Houten, 1997; Croteau et al., 1999). Todos os 13 polipeptídeos codificados pelo DNAm<sub>t</sub> são essenciais ao funcionamento adequado de 4 dos 5 complexos da fosforilação oxidativa (Figueira et al., 2013). Desta forma, a estabilidade genética do DNAm<sub>t</sub> é essencial à função mitocondrial, portanto também para a manutenção da vida. De fato, mais de 150 mutações patogênicas nessa molécula, causam doenças clinicamente definidas (Wallace, 1999).



**Esquema 5. Organização do DNAm humano.** O DNAm humano é uma molécula circular, contendo 16569 pares de bases. As duas fitas são denominadas pesada e leve, devido ao conteúdo diferencial de guaninas na fita pesada. A região *D-loop*, não codificante, contém os promotores para as fitas pesada e leve, bem como a origem da replicação da fita pesada de DNAm<sub>t</sub>. A disposição de todos os 37 genes é apresentada. Adaptado de Lagouge e Larsson, 2013.

As doenças mitocondriais podem apresentar uma enorme variedade de padrões de herança, maternas, Mendeliana e uma combinação de ambas. Somado a isso, existe o fato dos fenótipos de doenças mitocondriais serem diversos e sobrepostos, o que significa dizer que uma mesma mutação no DNAm<sub>t</sub> pode resultar em fenótipos bem diferentes e mutações diferentes podem resultar num mesmo fenótipo, por isso é mais coerente classificar os pacientes pelo defeito genético do que pela manifestação clínica (Wallace, 2013). Mutações patogênicas no DNAm<sub>t</sub> incluem tanto substituição de bases como rearranjos (Mitomap). As substituições de base podem ser sub-divididas em mutações *missense* que afetam 13 genes codificadores de proteínas e as mutações que afetam os genes de rRNA ou tRNA, as quais exercem efeito global na síntese proteica mitocondrial (Shoffner e Wallace, 1995; Brown e Lott, 1996).

As mutações no DNAm<sub>t</sub> que causam as doenças de LHON, distonia e doença de Leigh, são bons exemplos da variabilidade clínica que pode acompanhar a mutação heteroplásmica *missense*. LHON e distonia podem causar a mesma mutação MTND6\*LDYT14459A, uma transição de G para A no gene mitocondrial ND6 que codifica uma sub-unidade da NADH desidrogenase. Essa mutação converte uma alanina altamente conservada em uma valina. Pacientes portadores de LHON apresentam na meia idade, cegueira de início súbito causada por morte do nervo óptico. Pacientes com distonia, apresentam em idade prematura, desordem de movimento generalizada, fala comprometida, retardo mental e baixa estatura, frequentemente acompanhada por degeneração da glândula basal cerebral. LHON está associado com uma baixa porcentagem de mutação no DNAm<sub>t</sub>, enquanto que a distonia está associada à alta porcentagem (Novotny, 1986; Jun et al., 1994; Shoffner, 1995). Mutações em genes mitocondriais de síntese proteica são capazes de produzir um complexo aglomerado de sintomas. Em casos severos, as mutações são heteroplásmicas e frequentemente causam anormalidades no sistema nervoso central (SNC) bem como miopatia mitocondrial com fibras áspero-vermelhas (Shoffner e Wallace, 1995; Brown e Lott, 1996), uma associação referida à encefalopatia mitocondrial. As manifestações do SNC podem incluir perda auditiva sensorial neural, epilepsia, episódios do tipo AVC (acidente vascular cerebral) e demência progressiva. Cardiomiopatias, acidose

láctica e desordens endócrinas incluindo diabetes, também são comuns (Brown e Lott, 1996).

As doenças de DNAm, comumente tem um início tardio e são progressivas. Isso implica que a expressão fenotípica dessas doenças envolve dois fatores, a mutação predisponente e um fator relacionado à idade que causa um declínio na função mitocondrial, o que exacerba o defeito herdado (Brown e Lott, 1996). Doenças mitocondriais resultado de mutações em genes nucleares da fosforilação oxidativa, apresentam um padrão de herança Mendeliana. Uma mutação no gene que codifica a proteína estrutural de 18 Kd do complexo I, está associada à manifestação de hipotonia infantil, retardo mental, convulsões e degeneração da gânglia basal (van den Heuvel et al., 1998). Outra mutação na protease adenosina trifosfato (ATPase), tem sido associada com paraplegia dominante espástica (Casari et al., 1998). Mutações em genes nucleares também podem empregar seus efeitos fenotípicos através de inativação indireta da fosforilação oxidativa ou desestabilização do DNAm. A ataxia de Friedreich é uma doença autossômica recessiva que resulta em ataxia cerebelar, neuropatia periférica e cardiomiopatia hipertrófica. A frataxina, proteína mutante, é direcionada para a membrana mitocondrial interna onde transporta o ferro para fora da mitocôndria. Com a perda dessa proteína, o ferro se acumula na matriz mitocondrial, estimulando a conversão de  $H_2O_2$  a  $OH^\bullet$  pela reação de Fenton. Isso inativa enzimas mitocondriais do centro Fe-S (complexos I, II e III e aconitase), o que por sua vez reduz a produção de energia mitocondrial (Rotig et al., 1997).

O início tardio e o curso progressivo das doenças mitocondriais, sugerem que a função mitocondrial deve decair com o avanço da idade. Esta hipótese encontra respaldo em inúmeras informações de declínio da atividade enzimática da fosforilação oxidativa em músculo esquelético, fígado e cérebro (Trounce et al., 1989) e o acúmulo de rearranjos de DNAm somático nesses mesmos tecidos. O acúmulo de mutações no DNAm somático pode ocorrer devido a dano gerado decorrente do ataque das espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. O declínio da capacidade oxidativa decorrente do avanço da idade, degradaria a capacidade bioenergética do tecido até um certo limiar que resultaria em senescência. Esse mesmo declínio poderia interagir com os defeitos mitocondriais herdados, o qual poderia contribuir para o início tardio e progressão das doenças

mitocondriais. As mutações no DNAm somático, também tem sido relacionadas com vários tumores. Essas mutações incluem deleções intragênicas (Horton et al., 1996), missense (Polyak et al., 1998) e alterações na sequência polimérica que resulta em mutações *frameshift* (Habano e Nakamura, 1998). A princípio, essas mutações poderiam contribuir para as transformações neoplásicas por mudar a capacidade de energia celular, aumentando o estresse oxidativo mitocondrial e/ou modulando a apoptose.

### **1.7. Biogênese mitocondrial**

O evento de biogênese mitocondrial é um processo central muito regulado uma vez que envolve a expressão coordenada de dois genomas, o mitocondrial que codifica 13 proteínas, e o nuclear, que codifica todas as outras proteínas necessárias ao processo. O ajuste muito fino entre núcleo e mitocôndria é essencial para que a eficácia do processo seja garantida. Um conjunto de fatores codificados no núcleo regulam coordenadamente a massa mitocondrial e função, em resposta a mudanças de disponibilidade de energia e demandas de crescimento, incluindo estresse metabólico celular, tal como a constante produção de EROs. O núcleo codifica fatores de transcrição e co-ativadores que governam a função mitocondrial, incluindo todas as proteínas envolvidas em replicação e transcrição do DNAm, incluindo o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que é essencial para a replicação e transcrição do DNAm (Scarpulla et al., 2012).

Os fatores respiratórios nucleares, NRF1 e NRF2, foram os primeiros fatores transcripcionais nucleares implicados no controle de múltiplas funções mitocondriais em vertebrados. NRF1, inicialmente identificado através da sua ligação com o promotor citocromo c, funciona como um regulador positivo da transcrição (Scarpulla, 2011). Ele age em genes codificadores de sub-unidades respiratórias (Kelly e Scarpulla, 2004). O NRF2 humano foi identificado como um ativador transcripcional da citocromo oxidase sub-unidade IV (COXIV). Evidências apontam que NRF1 e NRF2 desempenham um papel direto na expressão de todas as 10 sub-unidades codificadas no núcleo de citocromo c oxidase (Ongwijitwat, 2006; Dhar, 2008). O controle da transcrição mitocondrial por ambos NRFs

pode ser parte de um mecanismo coordenando a expressão da cadeia respiratória com a biogênese da organela. Deleções genéticas de NRFs e outros fatores respiratórios nucleares, tal como o gene da proteína repressora transcricional YY1, resultam em letalidade peri-implantação em roedores (Donohoe, 1999; Huo e Scarpulla, 2001).

O PPAR $\alpha$  (receptor peroxissomo proliferador-ativado  $\alpha$ ) é um membro da família de receptores nucleares (de *nuclear receptors*, NRs) incluindo o PPAR $\beta$  (também conhecido como PPAR $\delta$ ) e PPAR $\gamma$ , um fator transcricional enriquecido em adipócitos, envolvido na diferenciação de adipócitos. Os PPARs ligam-se a elementos de resposta no DNA como heterodímeros com membros da família receptor retinóide x (RXR). Um aspecto interessante dos PPARs é que eles são ativados por uma gama de ácidos graxos, incluindo ligantes lipídicos, contudo os ligantes endógenos para os PPARs não foram claramente identificados. A ativação de PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  por ligantes lipídicos promove um programa para mudanças de transdução no metabolismo lipídico celular para o controle transcricional da oxidação de ácidos graxos mitocondrial, uma fonte chave para produção de ATP em coração e músculo (Madrazo e Kelly, 2008).

PGC1 $\alpha$  é um membro da família de coativadores transcricionais, a qual inclui PGC1 $\beta$  e mais distante PRC. Estudos de superexpressão em cultura de adipócitos (Puigserver, 1998), miócitos cardíacos (Lehman, 2000) e em camundongos transgênicos (Russell, 2004) demonstraram que PGC1 $\alpha$  é capaz de dirigir virtualmente todos os aspectos da biogênese mitocondrial, incluindo ativação da cadeia respiratória e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, aumento do número de mitocôndrias e aumento da capacidade respiratória, através de interação direta e co-ativação de PPARs, ERRs e NRF1/NRF2, dentre outros fatores transcricionais. A sinalização metabólica através de PGC1 $\alpha$  ocorre, em parte, através de modificações pós-traducionais. Por exemplo, PGC1 $\alpha$  é diretamente regulada pela deacetilação (por SIRT1) e fosforilação (por AMPK) em resposta a mudanças em nutrientes ou depleção energética (Gerhart-Hines, 2007; Jager, 2007). As vias de SIRT1 e AMPK também podem cooperar na promoção de biogênese mitocondrial cálcio-dependente em miócitos (Canto, 2009; Iwabu, 2010). O controle de PGC1 $\alpha$  por AMPK e SIRT1 é sugestivo de uma ligação entre biogênese mitocondrial e vias de sinalização metabólica. Em camundongos, a ablação de SIRT1 torna o animal insensível aos efeitos da restrição



calórica, enquanto sua superexpressão promove efeitos benéficos da restrição calórica, mesmo quando o camundongo é alimentado normalmente (Donmez e Guarente, 2010).

O AMPK serve como uma ligação entre a biogênese mitocondrial regulada por PGC1 $\alpha$  e o coativador transcricional ativado por BREB, ou alvo para o complexo sensível a rapamicina I (TORC1). A sub-regulação de TORC1 promove autofagia, incluindo mitofagia, para aumentar a disponibilidade de intermediários de metabolismo sob condições metabólicas adversas. AMPK pode inibir o crescimento celular e promover autofagia através da inibição de TORC1 pela fosforilação direta de uma sub-unidade TORC1 (proteína regulatória associada a mTOR) (Gwinn, 2008) e por fosforilação regulador TDC2 (Inoki, 2003). A AMPK também pode estimular a destruição de mitocôndrias defeituosas através de mitofagia por fosforilação direta (Egan, 2011; Kim, 2011), assim AMPK pode potencialmente aumentar a síntese de novas mitocôndrias através de sua ativação de PGC1 $\alpha$ , e ao mesmo tempo promover a depuração de mitocôndrias defeituosas enquanto suprime o crescimento celular.



## *2. Objetivos*



## **2.1. Objetivo Geral**

Uma vez que resultados anteriores da literatura indicam que a proteína XPC pode modular o reparo de bases oxidadas via uma interação física e funcional com a DNA glicosilase OGG1, e que esta glicosilase desempenha um papel fundamental no reparo de lesões oxidadas no DNAm, o objetivo deste trabalho é determinar se a ausência de XPC causa alterações genômicas e bioenergéticas em mitocôndrias de células humanas.

## **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar o consumo de O<sub>2</sub> em células controle e XP-C;
- Determinar a produção de EROs, bem como a atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD e GPx);
- Determinar a quantidade de mitocôndrias em células controle e XP-C;
- Analisar a expressão dos genes relacionados à biogênese mitocondrial;
- Determinar a quantidade de lesões de DNA em células controle e XP-C.



### *3. Material e Métodos*





**3.1. Reagentes** – A maioria dos reagentes utilizados nessa tese foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Life Technologies (Nova Iorque, EUA) e Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes utilizados nos experimentos dessa tese foram do mais alto grau de pureza necessário aos experimentos realizados.

**3.2. Meio de reação padrão** – O meio de reação padrão possui a seguinte composição: sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM,  $K_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  2 mM. Esse meio foi mantido a 37°C e pH 7,2 para todos os experimentos envolvendo células permeabilizadas.

**3.3. Cultura de células** – As linhagens celulares humanas, fibroblastos SV40-transformados MRC-5 (controle) e XP4PA (XP-C) e os fibroblastos primários humanos AS405 (controle) e XP17VI (XP-C), primeiramente isolados pelo Prof. Dr. Alain Sarasin do Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Pesquisa do Câncer, França, foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Todas as células foram mantidas em DMEN alta glicose suplementado com 10% SFB, penicilina 100 IU/mL e em streptomicina 100 µg/mL, a 37° C em atmosfera com 5%  $CO_2$  até 80 % de confluência.

**3.4. Medida da atividade da enzima Citrato Sintase** - A reação catalizada pela citrato sintase consiste na condensação do oxaloacetato à molécula de acetil-coenzima A e água, formando citrato mais CoA-SH. O ensaio para atividade da enzima consiste em promover a reação irreversível na qual o CoA-SH gerado reagirá com o DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)), produzindo o TNB (ácido tionitrobenzóico) mais CoA-S-S-TNB. A formação de TNB pode, então, ser seguida espectrofotometricamente

Esse ensaio enzimático foi adaptado à microplaca com base nos protocolos da empresa Oroboros<sup>®</sup> Instruments (Oroboros, 2010) e disponíveis *on-line* no site da própria empresa. Para a realização desse ensaio, foram utilizadas cerca de  $8 \times 10^6$  células homogeneizadas em homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem*, em tampão PBS gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para as análises enzimáticas. A concentração protéica das

amostras foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976), com BSA como padrão. Em microplaca para espectro visível, foram pipetadas cerca de 3,0 µg de amostra em cada poço, sobre as quais foi adicionado um mix de reagentes contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 7,1), oxaloacetato 250 µM, DNTB 100 µM e acetil-coenzima A 50 µM. Durante 5 minutos foi monitorada a absorvância em 412 nm, a 30°C, e calculada a inclinação por minuto do branco e das amostras.

Em seguida, utilizando-se o coeficiente de absorvância molar para o TNB ( $13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), foram efetuados os cálculos até que se obtivesse o valor da atividade enzimática em mU/mL. Foi feita a correção para o caminho óptico referente ao volume de 0,2 mL utilizado nesse ensaio. Após a dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976), os dados foram normalizados em relação à quantidade de proteína adicionada ao ensaio e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

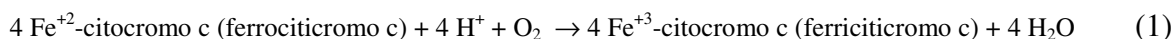
**3.5. Determinação do número de cópias de DNAm<sub>t</sub>** – As amostras de DNA foram isoladas através do Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen<sup>®</sup>, Germantown, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando-se SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystem<sup>®</sup>, Foster City, California, USA) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, em 25 µL de reação havia 12,5 µL 2X SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, *primers* 5 pmol cada e 20 ng de DNA padrão. Os seguintes genes foram escolhidos para a análise da qPCR: *HPRT* para controle de carregamento do DNA nuclear, gene *NDI* para número de cópias de DNAm<sub>t</sub> e gene *ND4L* para deleção de DNAm<sub>t</sub>. *ND4L* foi escolhido como um marcador de deleção devido a grande frequência de deleções na região genômica no qual esse gene está localizado em populações humanas (Damas et al., 2012). A sequência de *primers* pode ser encontrada na **Tabela 1**:

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para qPCR para número de cópias de DNAm.

Gene alvo	Símbolo oficial	mRNA RefSeq	Direção	Sequência (5'-3')
<i>HPRT</i>	Hprt	NM_000194.2	Sense	TGA CAT GTG CCG CCT GCG AG
			Antisense	GTG GTC GCT TTC CGT GCC GA
<i>ND1</i>	ND1	NC_012920.1	Sense	ACT ACG CAA AGG CCC CAA CG
			Antisense	GAG CTA AGG TCG GGG CGG TG
<i>ND4L</i>	ND4L	NC_011137.1	Sense	AAC CCT CAA CAC CCA CTC CCT CTT
			Antisense	TAGGCC CAC CGC TGC TTC GC

**3.6. Medida do consumo de oxigênio** – O consumo de O<sub>2</sub> em células permeabilizadas (2x10<sup>6</sup> cels/ml) foi monitorado através de um eletrodo Hansatech (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, UK) e em oxígrafo de alta resolução Oxygraph-2k, marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, AUT) com o uso do programa ao *software* DataLab versão 4.2.0.73 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As células foram permeabilizadas com 30 µM digitonina em 2 mL de meio de reação padrão contendo 5 mM de substrato respiratório para complexo I (glutamato, α-cetoglutarato, malato e piruvato). Foram feitas adições sequenciais de 100 µM ADP, 4 µM CAT e 1 µM FCCP. Este experimento foi realizado em eletrodo Hansatech. Para analisar os complexos II, III e IV, também foram utilizados 2 mL de meio de reação padrão e 30 µM digitonina, porém agora as adições sequenciais foram de: 5 mM succinato, 100 nM FCCP, 1 µM Antimicina A e 200 µM TMPD + 2 mM Ascorbato. Este experimento foi realizado no oxígrafo Oroboros. Todas as análises foram feitas a 37 °C.

**3.7. Medida da atividade da enzima Citocromo c Oxidase** - As medidas de atividade da citocromo c oxidase foram feitas com base no protocolo do kit comercial para esse ensaio enzimático (Sigma Product Information<sup>®</sup>, Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Technical Bulletin). O princípio desse ensaio enzimático consiste em monitorar a queda no valor de absorvância em 550 nm, devido à oxidação, via atividade da citocromo c oxidase, do citocromo c reduzido adicionado ao ensaio. A reação está descrita a seguir (1) identificando a oxidação de ferrocitocromo c a ferricitocromo c.



Para a realização desse ensaio, foram utilizadas cerca de  $8 \times 10^6$  células homogeneizadas em homogeneizador de vidro do tipo Potter, em PBS gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 2 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi recolhido para as análises enzimáticas.

Em cubeta de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a  $25^\circ\text{C}$ , foram adicionados tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0) com KCl 120 mM, tampão de diluição de amostra ou de enzima Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) contendo sacarose 250 mM. Para a redução do ferrocitocromo c a ferricitocromo c foi adicionado DTT (ditiotreitól) 500  $\mu\text{M}$  à solução estoque de ferrocitocromo c 0,22 mM. Após uma hora de incubação, uma alíquota diluída 20 vezes foi monitorada em dois comprimentos de onda (550 e 565 nm). A razão entre os valores de absorvância nesses dois comprimentos de onda ( $A_{550}/A_{565}$ ) deve estar entre 10 e 20 para que o reagente alcance uma taxa de redução apropriada para seu uso nesse ensaio. Aos tampões do ensaio foi adicionado citocromo c reduzido 1  $\mu\text{M}$  e monitorada a variação de absorvância em função do tempo em 550 nm. A diferença nos coeficientes de absorvância molares ( $\Delta\epsilon$ ) entre o estado reduzido e oxidado do citocromo c é de 21,84 mM. O volume final do ensaio foi de 1,1 mL.

Após a obtenção da variação de absorvância por minuto, aplicamos a fórmula geral para ensaios enzimáticos mostrada a seguir (2).

$$(U/L) = \frac{\Delta Abs \times VT \times 1000}{\epsilon \times c \times VA} \quad (2)$$

Sendo:

$\Delta Abs/min$  = Abs amostra/min – Abs branco/min

VT = Volume total do ensaio (mL)

1000 = fator de diluição para converter a L

$\epsilon$  = coeficiente de absorvância molar, em  $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

c = caminho óptico, em cm

VA = Volume da amostra adicionada, em mL

Omitimos o fator de diluição 1000 para a conversão a litro (L). Dessa forma, tem-se o valor de atividade enzimática em U/mL, o que facilita a divisão pela concentração de proteína, que está em mg/mL, anulando o termo mL.

Os dados de U/mL foram normalizados em relação à quantidade de proteína (em mg) adicionada ao ensaio e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

**3.8. Medida da captação de íons  $\text{Ca}^{2+}$**  - Células ( $4 \times 10^6$  ou  $8 \times 10^6$ ) foram adicionadas em meio de reação padrão, contendo *Calcium Green*  $0,2 \mu\text{M}$ , um marcador fluorescente que se liga ao cálcio presente no meio e promove um aumento na fluorescência de emissão, tapsigargina  $2 \mu\text{M}$  (previne a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático), oligomicina  $1 \mu\text{g/mL}$  (para inibir a ATP sintase, uma vez que a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático depende de ATP) e/ou CsA  $0,5 \mu\text{M}$  ou ADP  $500 \mu\text{M}$ . Os experimentos foram conduzidos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi, Tóquio, Japão) com excitação a  $506 \text{ nm}$  e emissão a  $532 \text{ nm}$ , com largura de fenda de  $2,5 \text{ nm}$ .

**3.9. Análise da produção de radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )** – Para a quantificação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , as células MRC-5 e XP4PA foram lavadas com PBS gelado e tripsinizadas. Logo após, elas foram tratadas com  $5 \mu\text{M}$  MitoSOX,  $5 \mu\text{M}$  Antimicina A (inibidor do complexo III da CTE) e  $5 \mu\text{M}$  DPI (inibidor da NADPH oxidase) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Depois do tratamento, as amostras foram analisadas no canal FL-2 do citômetro de fluxo de acordo com protocolos estabelecidos (Payne et al., 2007).

**3.10. Análise da produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** – A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelas células MRC-5 e XP4PA foi monitorada espectrofluorimetricamente em espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japão) usando Amplex Red<sup>®</sup> (N-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine)  $10 \mu\text{M}$  na presença de peroxidase  $1 \text{ U/mL}$  (Zhou et al., 1997). A fluorescência foi monitorada em  $563 \text{ nm}$  para excitação e  $587 \text{ nm}$  para emissão, com a largura da fenda de  $2,5 \text{ nm}$ . A calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio. Os experimentos foram conduzidos a  $37^\circ\text{C}$  em solução balanceada de Hank's (HBSS) suplementado com  $10 \text{ mM}$  (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-

N, -[2-ethanesulfonic acid]; HEPES). O cálculo das velocidades foi realizado considerando-se os dois minutos finais de traçado, nos quais é feita a regressão linear e, a partir da equação da reta obtida para o intervalo de tempo adotado, são calculadas as variações de fluorescência por unidade de tempo. Com a calibração feita com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AmplexRed<sup>®</sup>, na presença de peroxidase (HRP), os valores de fluorescência por unidade de tempo (unidades arbitrárias/min) foram convertidos a valores de quantidade por unidade de tempo (pmol/min). A catalase foi utilizada para dar a certeza de que a espécie reativa sendo formada era H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**3.11. Medida da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)** – A medida da atividade de SOD foi determinada pelo Kit SOD activity colorimetric assay kit (Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, MA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

**3.12. Medida da atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)** - O ensaio para a atividade da enzima glutathiona peroxidase foi realizado com base em Lawrence e Burk (1976). Foram utilizadas cerca de  $8 \times 10^6$  células homogeneizando-as em 1 mL de PBS gelado. Foram utilizados 25 µL do homogenato para os ensaios, representando, aproximadamente, 100 µg de proteína total.

Em cubeta de quartzo de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a 25°C, foram adicionados tampão fosfato dibásico de potássio 100 mM (pH 7,7), EGTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 µM, NADPH 150 µM, glutathiona redutase (GR) 60 mU/mL e glutathiona reduzida (GSH) 5 mM. O volume final do ensaio foi 1,0 mL.

Após a adição dos reagentes descritos, exceto GSH, monitorou-se o branco da reação na presença de excesso de GR, em 340 nm. Em seguida, adicionou-se GSH e foi monitorada, durante 1 minuto, a queda na absorbância de NADPH devido à atividade da enzima GR. Foram adicionados 25 µL de homogenato celular (aproximadamente 100 µg de proteína) a fim de monitorar a atividade total (GR+GPx). Como havíamos monitorado a atividade da enzima GR anteriormente, com excesso da mesma, a fim de que ela não fosse fator limitante para a reação, descontamos sua atividade da atividade total, obtendo a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx). Para os cálculos da atividade, em

mU/mg de proteína, foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a atividade de Citocromo c Oxidase.

**3.13. Análise de dano ao DNA por XL-PCR** – As amostras de DNA foram isoladas através do Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen<sup>®</sup>, Germantown, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi conduzida de acordo com Santos et al. (2012) com pequenas modificações. Cada 50 µL de reação continha 15 µL de tampão 3.3X XL PCR, 2.6 µL de 25 mM de acetato de magnésio (1.3 mM), 0.5 µL de 10 mg/mL de albumina sérica bovina (0.1 mg/mL), 2 µL de 10 µM *primer* cada (20 pmol), 4 µL de 2.5 mM dNTP (200 nM), 5 µL de 0.2 U/µL *rTth* DNA polimerase XL (1 U) e 5 µL de 3 ng/µL DNA padrão (15 ng). Uma etapa de anelamento de 30 s a 64°C e um aumento na etapa de desnaturação para 30 s foram adicionadas aos parâmetros do ciclo. Os produtos da reação foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 0,8% a 5 V/cm por 4 h em tampão TAE (40 mM Tris-acetato pH 7.8, 1 mM EDTA). O gel foi corado em 2 mg/L de brometo de etídeo por 30 min e lavado em água deionizada por 10 min. As imagens foram captadas em ImageQuant 300 (GE Life Sciences) e analisadas em ImageJ. O padrão de carregamento de DNA foi corrigido pelo método  $\Delta\Delta C_t$  da qPCR para número de cópias de DNAm (Damas et al., 2012).

**3.14. Análise da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial** – a extração do RNA foi realizada através do Kit RNeasy Micro Kit, Qiagen<sup>®</sup> (Germantown, MD) cuja tecnologia permite a purificação do RNA (máximo 45 µg) de pequenas quantidades de tecidos e células. Os níveis de mRNA de *PGC1 $\alpha$* , *NRF1*, *NRF2*, *PPAR $\alpha$* , *AMPK*, *SIRT1*, *SIRT3* e *SDHA* foram medidos pelo ensaio quantitativo qRT-PCR, com *primers* específicos para os mRNAs desses genes e  *$\beta$ -actina* como controle de carregamento. O RNA total extraído das células MRC-5, XP4PA, AS405 e XP17VI foi convertido a cDNA pelo Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). O *Power SYBR Green PCR Master Mix*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) foi utilizado nesses ensaios. *Cycling* e *reading* foram realizados no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) de acordo com protocolos padrão do

equipamento. A análise dos dados foi realizada como previamente descrito (Pfaffl, 2001). A sequência de *primers* pode ser encontrada na **Tabela 2**:

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para qRT PCR para expressão de genes de biogênese mitocondrial

Gene alvo	Símbolo oficial	mRNA RefSeq	Direção	Sequência (5'-3')
<i>β-actin</i>	ACTB	NM_001101.3	Sense	CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT
			Antisense	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<i>PGC1α</i>	PPARGC1A	NM_013261.3	Sense	AGA CAC CGC ACG CAC CGA AAT
			Antisense	AGC TGT CAT ACCTGG GCC GAC G
<i>NRF1</i>	NRF1	NM_005011.3	Sense	CTC TGA GAA CTT CAT GGA GGA ACA
			Antisense	GGT GTC CTC GGG AGA AGA AAG
<i>NRF2</i>	NFE2L2	NM_006164.4	Sense	TAC TCC CAG GTT GCC CAC A
			Antisense	CAT CTA CAA ACG GGA ATG TCT GC
<i>PPARα</i>	PPARA	NM_005036.4	Sense	GTCTCC CAG TGG AGC ATT GA
			Antisense	ACC AGC TTG AGT CGA ATC GT
<i>AMPK</i>	PRKAA1	NM_006251.5	Sense	TCT GTA AGA ATG GAA GGC TGG A
			Antisense	GGA CCA CCA TAT GCC TGT GA
<i>SIRT1</i>	sirtuin 1	NM_012238.4	Sense	TGG GTA CCG AGA TAA CCT TCT
			Antisense	TGT TCG AGG ATC TGT GCC AA
<i>SIRT3</i>	sirtuin 3	NM_012239.5	Sense	CAC AGT CTG CCA AAG ACC CT
			Antisense	CAA TGT CGG GCT TCA CAA CG
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex subunit A, flavoprotein (Fp)	NM_004168.2	Sense	CCT TTC TGA GGC AGG GTT TA
			Antisense	AGA GCA GCA TTG ATT CCT CC

**3.15. Isolamento da mitocôndria da célula** – As células foram tripsinizadas, lavadas em tampão MSHE (210 mM manitol, 70 mM sacarose, 10 mM HEPES-KOH pH 7,4, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA) suplementado com 0,15 mM espermina, 0,75 mM espermidina, 5 mM DTT e coquetel inibidor de protease (Roche) adicionado antes do uso e homogeneizado com homogeneizador *Potter-Elvehjem glass/glass*. As células foram sujeitas a um suave tratamento com digitonina antes da homogeneização para garantir a permeabilização da membrana plasmática, verificada através da coloração com azul de tripan. O homogenato foi centrifugado a 700 g por 12 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O *pellet* da primeira centrifugação foi homogeneizado novamente, centrifugado a 700 g e o sobrenadante foi associado e centrifugado a 9.000 g. O *pellet* resultante (fração mitocondrial bruta) foi ressuspensão em gradiente 1:1 Percoll/2XMSHE em tubo de ultracentrifugação e colocado sobre uma solução de 1:1 Percoll:2X MSHE e



centrifugado a 50,000 g por 1 h 10 min. A camada mitocondrial foi coletada, lavada em 1X MSHE e ressuspensa em MSHE, *snap*-congelado, e estocado a -80 °C. O *pellet* contendo a fração nuclear foi utilizado como controle de carregamento para checar a pureza da fração mitocondrial. A concentração de proteína das frações nuclear e mitocondrial foi determinada pelo método de Bradford (Ensaio Proteico Bio-Rad, Bio-Rad) usando BGG como padrão e estocado a -80°C até o uso.

**3.16. Western blotting para localização de XPC** – As frações nuclear e mitocondrial foram diluídas em tampão de carregamento proteico contendo SDS com  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas a 95°C por 10 minutos. Os extratos foram separados usando SDS-PAGE utilizando protocolos padrão. As proteínas foram transferidas para membranas PVDF (0,2- $\mu$ m) em tampão de transferência contendo 10–20% metanol. As membranas foram bloqueadas em 5% de leite em TBS-T, tanto em 1–2 h em temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. Incubações com anticorpos primários foram realizadas em 1% de leite em TBS-T, tanto em 1–2 h em temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, com os seguintes anticorpos: anti-Lamina B2 (X223) (1:1000; *mouse* sc-56147 de Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-PCNA (F-2) (1:1000; *mouse* sc-25280 de Santa Cruz Biotechnology), anti-ATPB [3D5] (1:1000; *mouse* ab-14739 de Abcam), anti-VDAC1 (D-16) (1:500; *goat* sc-32063 de Santa Cruz Biotechnology), anti-Mitofusina 1 (H-65) (1:500; *rabbit* sc-50330 de Santa Cruz Biotechnology) e anti-XPC (1:400; *rabbit* ab21078 de Abcam). Depois da lavagem com TBS-T, anticorpos secundários apropriados ligados a peroxidase de raiz foram adicionados em diluição de 1:5000 (*bovine* anti-*goat*, *goat* anti-*rabbit* e *goat* anti-*mouse*: Santa Cruz Biotechnology) em 1% de leite em TBS-T. Membranas foram então lavadas repetidamente com TBS-T e visualizadas usando Amersham ECL Plus (GE Healthcare). Porcentagem dos géis – 10%.

**3.17. Imunofluorescência para localização de XPC** – Células controle e XP-C foram semeadas numa concentração de 250.000 cels/well numa lâmina de vidro circular (12 mm de diâmetro) em placas de 24 poços (Deckglaser, Knittel Glaser, GER). Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS 1x contendo cálcio e magnésio e fixadas com metanol gelado (-20°C) por 10 min a temperatura ambiente e posteriormente bloqueadas com tampão (PBS, BSA 2% e 0-0.05% Tween) por 1 h. Anticorpos monoclonal

*mouse* anti-XPC e monoclonal *rabbit* anti-piruvato desidrogenase E1-alpha (Abcam, Cambridge, MA, EUA) foram diluídos 1:50 e 1:250 respectivamente, e incubados *overnight* a 4°C. Anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa 594 e anti-*rabbit* Alexa 488 (Invitrogen; San Diego, CA, EUA) foram diluídos 1:200 e aplicados por 1h a temperatura ambiente. Os *slides* foram montados com Vectashield Mounting Medium com DAPI (Vetor). As imagens foram adquiridas em um microscópio Zeiss Axio Observer.A1 Inverted (Zeiss, GER) sob campo microscópico (X630).

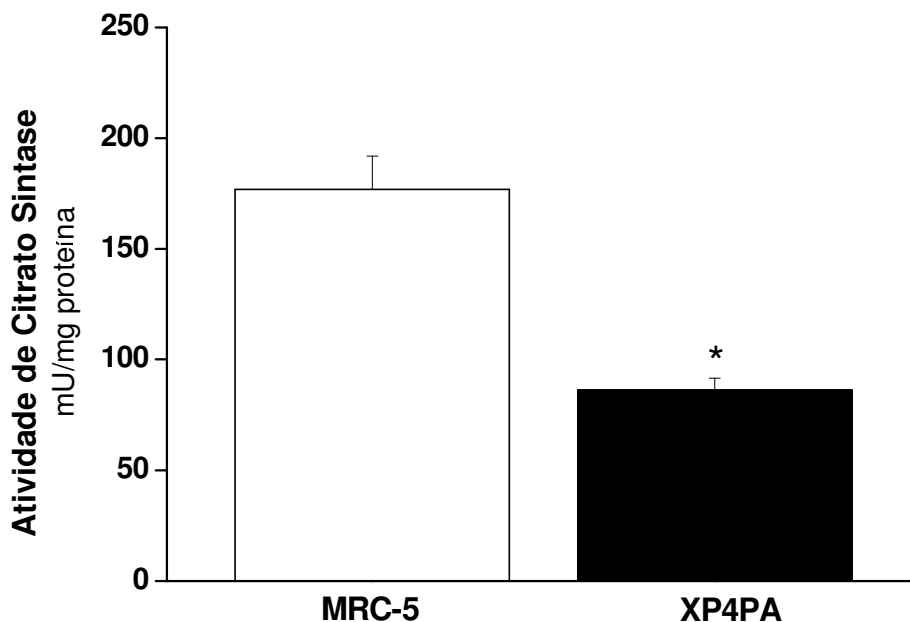
**3.18. Análises estatísticas** – As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Chicago, IL, EUA). Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  e.p.m.), submetidos ao teste *t-Student* não-pareado. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes. Foi considerado  $p < 0,05$  como diferença estatisticamente significativa.

## *4. Resultados*



#### 4.1. Atividade enzimática de citrato sintase em células controle e XP-C

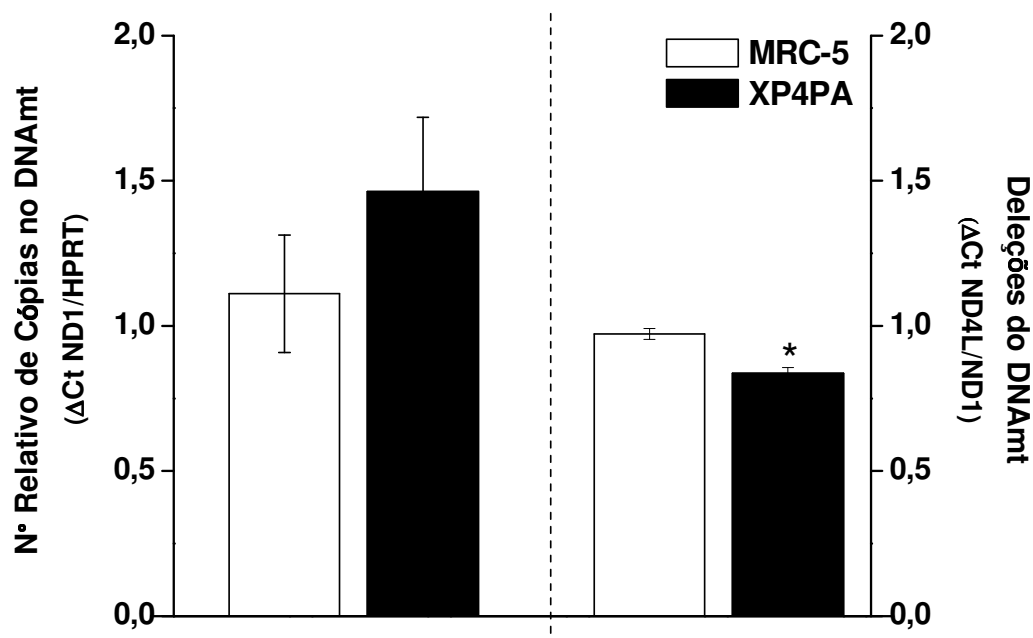
A atividade da enzima citrato sintase (CS) é comumente utilizada como um indicador de número de mitocôndrias, uma vez que esta é expressa constitutivamente, e não parece variar em inúmeras condições experimentais já investigadas (Booth e Kirby, 1991). Uma vez que nosso objetivo era avaliar a função mitocondrial em células deficientes em XPC, iniciamos medindo a atividade de CS em fibroblastos humanos normais, MRC-5, e XP-C, XP4PA, utilizando um ensaio que monitora a conversão de DTNB (5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), produzindo TNB (ácido tionitrobenzóico) pela citrato sintase. Este ensaio buscou verificar se havia diferença no número de mitocôndrias entre as duas linhagens. O resultado apresentado na **Figura 1** mostra que as células XP-C possuem metade da atividade de citrato sintase comparada ao controle, sugerindo que há menos mitocôndrias na célula XP-C.



**Figura 1.** Atividade de citrato sintase (mU/mg de proteína) em células controle e XP-C. Em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), a 30°C, foi monitorada, durante 5 minutos (412 nm), a conversão de DTNB a TNB pela enzima citrato sintase. Cerca de 3,0 µg de proteína total da célula foi utilizada para o ensaio. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4), considerando significativo\* p<0,05.

## 4.2. Número de cópias de DNAm

Outro indicador quantitativo do número de mitocôndrias por célula, é o número de cópias de DNAm. Desta forma, medimos, usando PCR quantitativo, o número de cópias de DNAm em células normais e XP-C. Curiosamente não encontramos diferenças entre as células controle e XP-C (**Figura 2**). Contudo o gene *ND4L*, que se localiza em uma região do genoma mitocondrial frequentemente deletada em populações humanas normais, estava significativamente diminuído quando comparado ao gene *ND1*, localizado em uma região raramente deletada em populações humanas normais (Damas et al., 2012). Essa observação indica que, em células XP-C, o DNAm apresenta um número significativo de cópias contendo deleções.



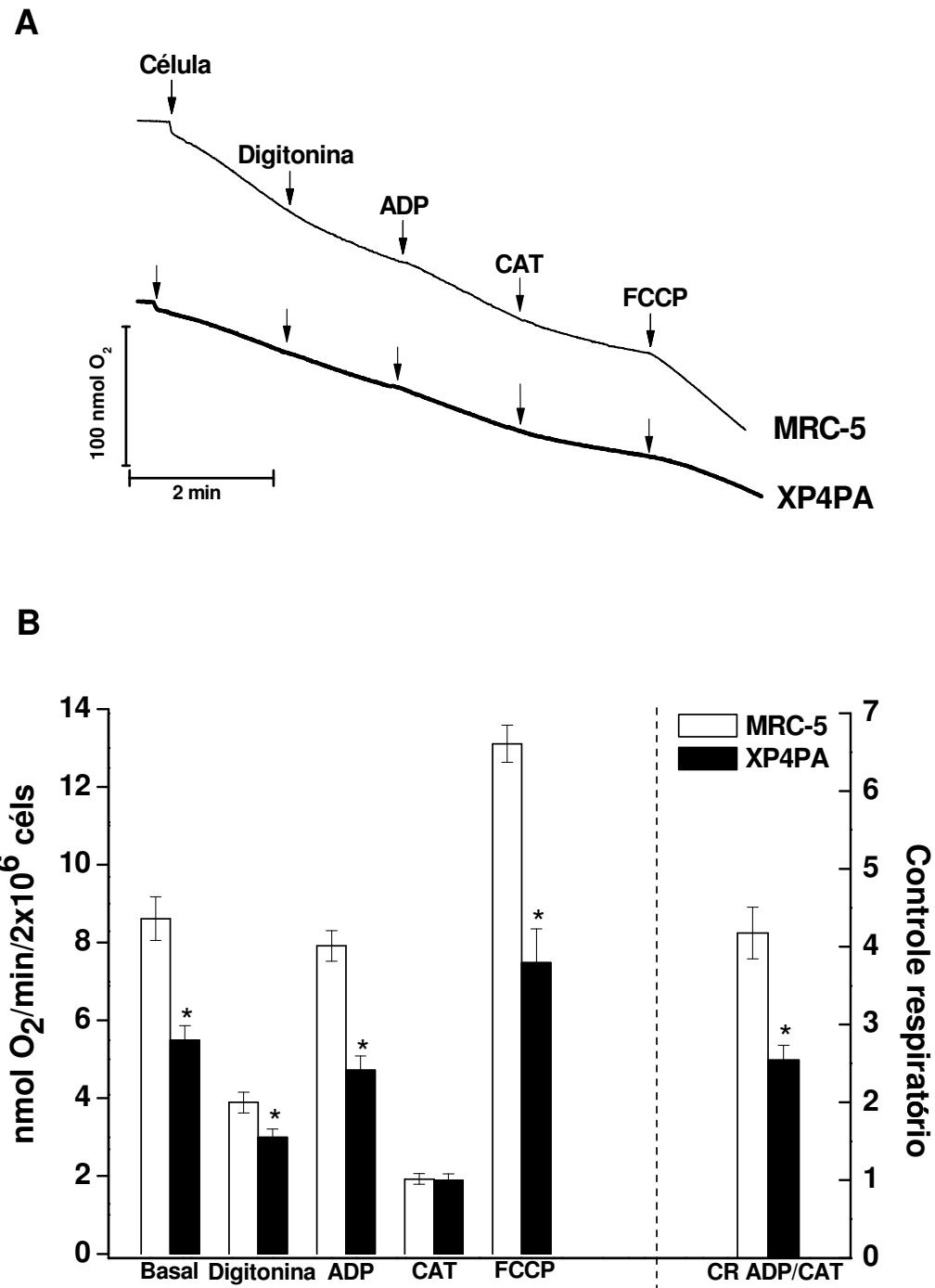
**Figura 2.** Número de cópias de DNA mitocondrial em células controle e XP-C. Amplificação relativa do gene *ND1* (DNAm) *versus* gene *HPRT* (DNA nuclear) Quantificação relativa do gene *ND4L* (frequentemente deletado) *versus* gene *ND1* (raramente deletado). Os valores Ct foram analisados pelo método  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=4), considerando significativo\* p<0,05.

### 4.3. Consumo de oxigênio do complexo I de células controle e XP-C

Para avaliar o efeito da ausência de XPC na função mitocondrial, inicialmente medimos o consumo de oxigênio por células permeabilizadas, na presença de substratos respiratórios que geram NADH, ou seja, que fornecem elétron para a cadeia transportadora de elétrons através da NADH desidrogenase, ou complexo I. As taxas de respiração do complexo I de células XP-C e controle foram comparadas em condições basais; após a permeabilização da membrana plasmática para o aporte dos substratos respiratórios (digitonina); em estado III, fosforilativo (ADP), em estado IV, não fosforilativo (CAT); e a velocidade máxima de respiração (FCCP) (**Figura 3A**). A partir desses dados, foi então calculado o controle respiratório (**Figura 3B**). Pôde-se observar uma diminuição significativa nos estados basal, permeabilizado com digitonina, estimulado com ADP e desacoplado por FCCP, bem como menor controle respiratório. Este resultado indica claramente que o complexo I da CTE das células XP-C apresenta menor atividade.

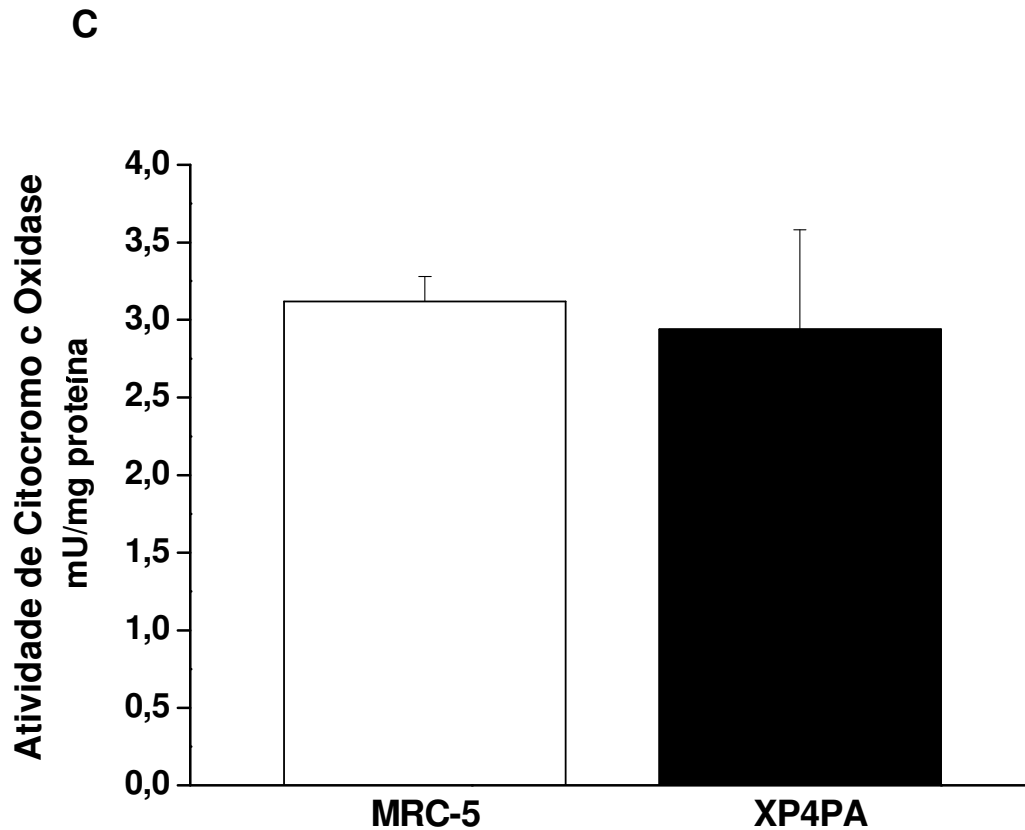
### 4.4. Atividade enzimática de citocromo c oxidase de células controle e XP-C

A diminuição da respiração via complexo I das células XP-C poderia ser decorrente de uma baixa atividade da enzima citocromo c oxidase, subunidade catalítica I (COX), uma das duas subunidades catalíticas do complexo IV da CTE, que cataliza a transferência final dos elétrons vindos através dos outros complexos respiratórios para o oxigênio molecular. Desta forma, alterações na atividade de COX poderiam limitar o consumo de oxigênio, independente do ponto de entrada de elétrons na CTE. O resultado da **Figura 4**, contudo, revela que não há diferenças na atividade de COX entre as células XP-C e controle, o que indica que a deficiência de consumo de oxigênio do complexo I não é devido à baixa atividade de citocromo c oxidase e que, conseqüentemente, não há inibição no complexo IV.



**Figura 3. Taxas de consumo de oxigênio via complexo I de células controle e XP-C. Painel A:** Figura representativa do experimento de consumo de oxigênio, nas condições descritas na seção Material e Métodos. As setas indicam a adição de  $4 \times 10^6$  células, em meio de reação padrão com adições subsequentes de  $30 \mu\text{M}$  Digitonina,  $100 \mu\text{M}$  ADP,  $4 \mu\text{M}$  CAT e  $1 \mu\text{M}$  FCCP. **Painel B:** Taxas de consumo de oxigênio e controle respiratório (CR). Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. ( $n=12$ ), considerando significativo\*  $p < 0,05$ .



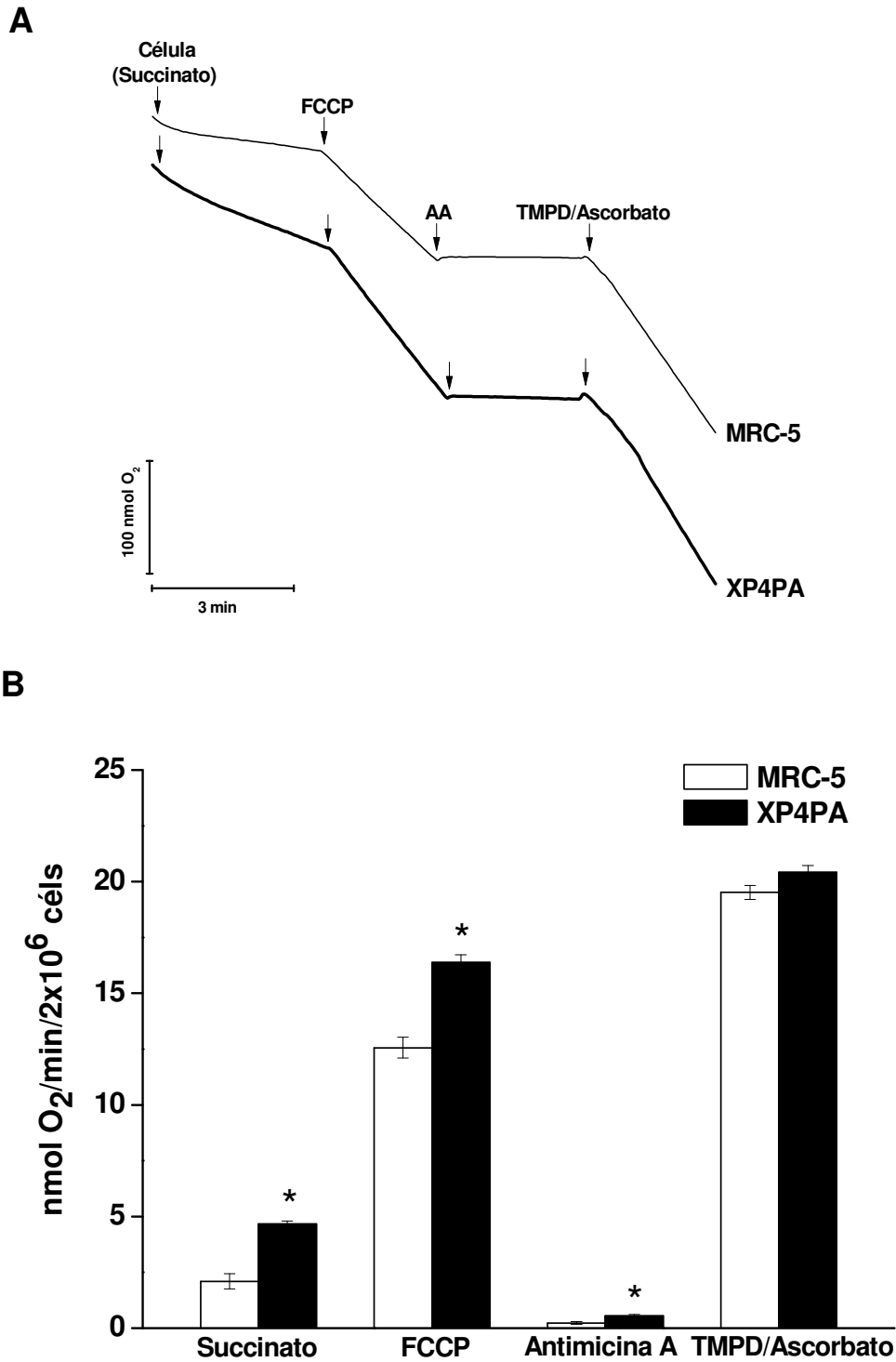


**Figura 4. Medida da atividade de Citocromo c Oxidase.** Para monitorar a atividade de citocromo c oxidase, 10  $\mu$ g de proteína celular total foi adicionada em 10 mM tampão Tris-HCl (pH 7,0) contendo 250 mM sacarose e 1 mM de citocromo c reduzido por 0,5 mM DTT. A redução nos valores de absorbância, devido à oxidação do ferrocitocromo c a ferricitocromo c foi monitorada a 550 nm em espectrofotômetro termostatizado a 25°C. Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=4), considerando significativo\*  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Consumo de oxigênio via complexos II, III e IV de células controle e XP-C

Uma vez que a respiração via complexo I estava menor em células XP-C, e que esse decréscimo não era devido à alterações na atividade de COX, nós partimos para a investigação dos demais complexos respiratórios. Diferentemente do que ocorre no complexo I, nos complexos II, III e IV, a taxa de consumo de O<sub>2</sub> de células XP-C estava maior comparada a células controle, utilizando succinato como substrato respiratório, que alimenta a CTE através da transferência de elétrons via succinato desidrogenase, ou complexo II. Também observamos uma taxa respiratória aumentada na presença de antimicina A, que inibe a passagem de elétrons entre os complexos I/III e II/III, e em condições de desacoplamento na presença de FCCP. Por outro lado, não foi observada diferença significativa na situação em que TMPD/Ascorbato foi usado como substrato respiratório, alimentando diretamente o complexo IV, confirmando mais uma vez, que a atividade deste complexo esta preservada em células XP-C (**Figura 5A e B**).

Esses resultados sugerem que a mitocôndria de XP-C pode estar num processo adaptativo, numa tentativa de suprir a deficiência do complexo I e assim reduzir ou prevenir o déficit bioenergético da mitocôndria, pois se houvesse um problema generalizado na CTE, essas células provavelmente não permaneceriam viáveis por longos períodos.



**Figura 5. Taxas de consumo de O<sub>2</sub> dos complexos II, III e IV em células controle e XP-C. Painel A:** Figura representativa do experimento de consumo de O<sub>2</sub>. As setas indicam a adição de 4x10<sup>6</sup> células, em meio de reação padrão com adições subsequentes de 30 μM Digitonina, 5 mM succinato, 1 μM Antimicina A e 200 μM TMPD + 2 mM Ascorbato. **Painel B:** Taxas de consumo de O<sub>2</sub>. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=6), considerando significativo\* p<0,05.

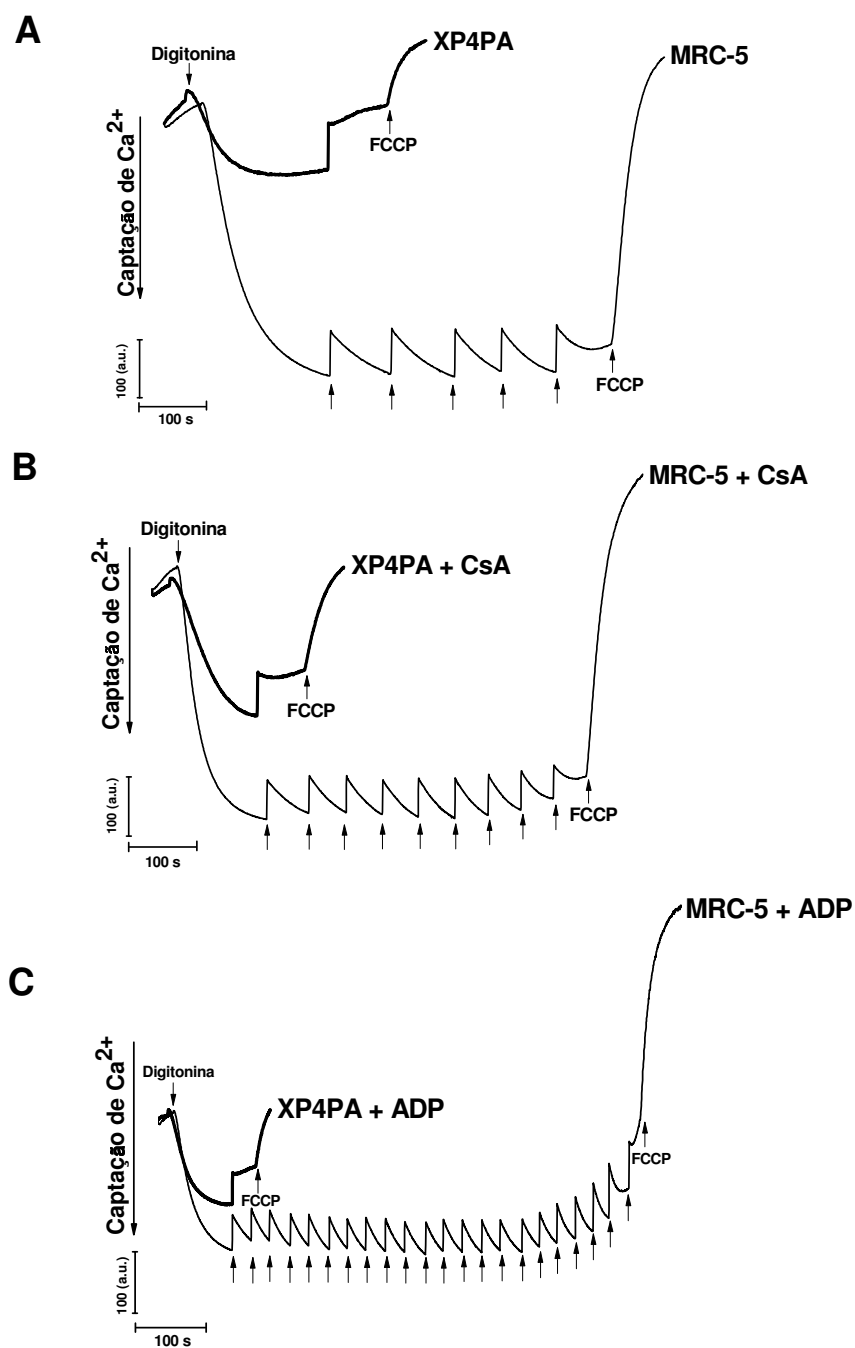
#### 4.6. Captação de $\text{Ca}^{2+}$ de células controle e XP-C

O controle da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre é fundamental para a homeostase celular, uma vez que a ligação deste íon a moléculas sinalizadoras participa do controle de vários processos celulares essenciais, como expressão gênica e controle de fluxo metabólico (Carafoli, 1987). Em células de mamíferos, as mitocôndrias participam ativamente do controle da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  através da ação de transportadores localizados na membrana mitocondrial interna, dependentes ou não de voltagem (Carafoli, 1987; Gunter e Gunter, 1994). Desta forma, avaliamos a capacidade de mitocôndrias de células normais e XP-C captarem e reterem concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , na presença de tapsigargina, que inibe a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático e oligomicina, inibidora da ATP sintase. Para isso, células XP-C e controle foram submetidas a adições sequenciais de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Enquanto as células controle conseguiam captar até 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , as células XP-C não eram capazes de captar nem mesmo 5  $\mu\text{M}$ , indicando que a mitocôndria de células XP-C eram mais sensíveis à permeabilização da membrana mitocondrial induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 6A**).

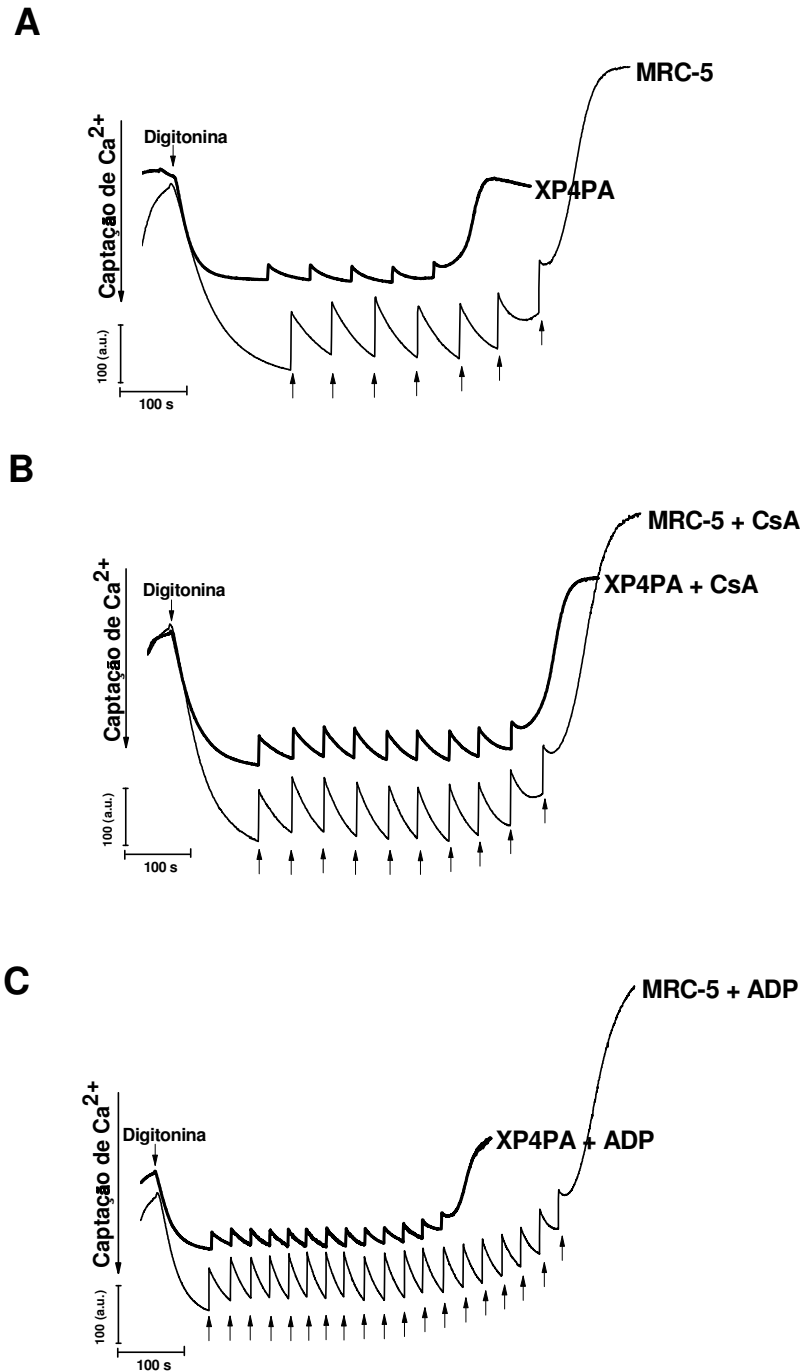
Esse efeito é, geralmente, atribuído à abertura de poros constituídos por agregados protéicos, envolvendo a oxidação de grupos sulfidríla de proteínas de membrana e à ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ , conhecidos como poros de transição de permeabilidade mitocondrial, ou TPM (Transição de Permeabilidade Mitocondrial). Entretanto, quando inibidores clássicos da TPM (CsA - **Figura 6B** ou ADP - **Figura 6C**), foram adicionados, a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  observada em células XP-C não mudou, indicando que a menor capacidade de captar e reter  $\text{Ca}^{2+}$  em células XP-C não está relacionada a indução de TPM.

Para esclarecer a possibilidade dessa sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  ser devido ao menor número de mitocôndrias da célula XP-C, resultado mostrado pela atividade de citrato sintase, nós tentamos igualar o número de mitocôndrias das duas células, colocando assim, o dobro de células XP-C ( $8 \times 10^6$ ) para captar a mesma quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sob essa condição, nós pudemos observar que as células XP-C, providas com o dobro de mitocôndrias das células controle, eram capazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  em quantidades similares à célula controle (**Figura 7A**). O mesmo ocorreu na presença de CsA (**Figura 7B**) e ADP (**Figura 7C**). Desta forma, este resultado sugere que a maior susceptibilidade à

permeabilização da membrana mitocondrial induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela diminuição no número de mitocôndrias funcionais.



**Figura 6. Captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em células controle e XP-C.**  $4 \times 10^6$  células foram adicionadas ao meio de reação padrão ( $37^\circ\text{C}$ ) contendo 5 mM de substrato respiratório para complexo I,  $1 \mu\text{g/mL}$  Oligomicina,  $2 \mu\text{M}$  Thapsigargina e  $0,2 \text{ mM}$  Calcium Green **Panel A:** Depois da adição de células,  $30 \mu\text{M}$  digitonina foi usada para permeabilizar a membrana plasmática. Adições sucessivas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) foram feitas e  $1 \mu\text{M}$  de FCCP foi adicionado ao final do experimento para dissipar o potencial de membrana. **Panel B:** Mesmo experimento do painel (A), porém ambas as células estavam na presença de  $1 \mu\text{M}$  CsA. **Panel C:** Mesmo experimento do painel (A), porém ambas as células estavam na presença de  $500 \mu\text{M}$  ADP. Essas são figuras representativas de 6 experimentos independentes.

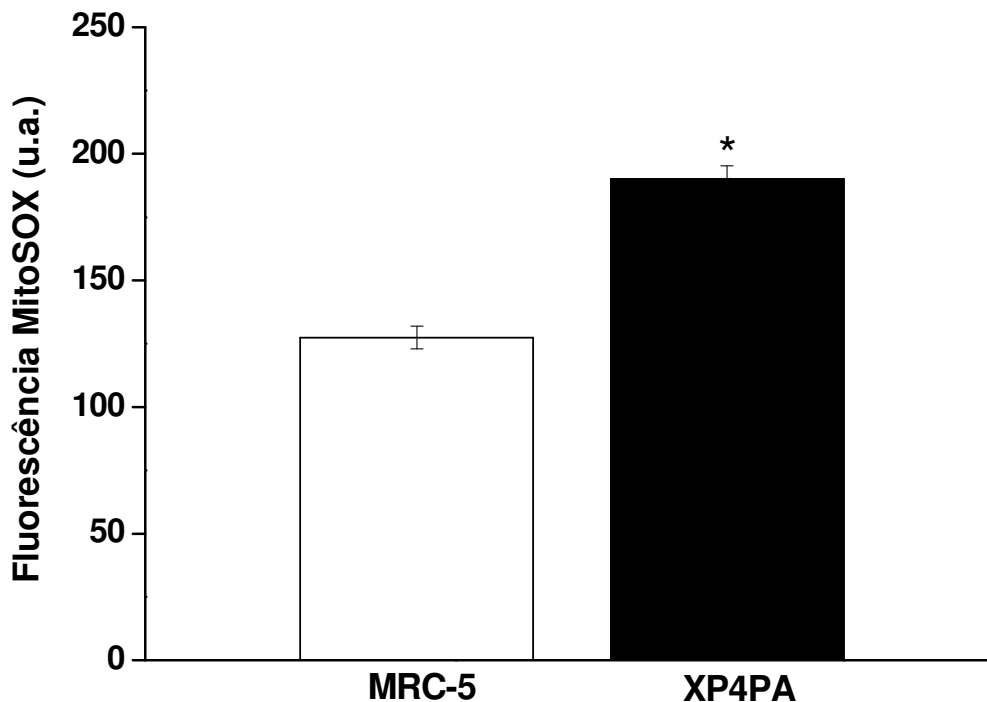


**Figura 7. Captção de Ca<sup>2+</sup> em células controle e XP-C (dobro de células do controle).**  $4 \times 10^6$  (MRC-5) e  $8 \times 10^6$  (XP4PA) células foram adicionadas ao meio de reação padrão (37°C) contendo 5 mM de substrato respiratório para complexo I, 1 μg/mL Oligomicina, 2 μM Thapsigargina e 0,2 mM Calcium Green. **Painel A:** Depois da adição de células, 30 μM digitonina foi usada para permeabilizar a membrana plasmática. Adições sucessivas de Ca<sup>2+</sup> (5 μM) foram feitas e 1 μM de FCCP foi adicionado ao final do experimento para dissipar o potencial de membrana. **Painel B:** Mesmo experimento do painel (A), porém ambas as células estavam na presença de 1 μM CsA. **Painel C:** Mesmo experimento do painel (A), porém ambas as células estavam na presença de 500 μM ADP. Essas são figuras representativas de 4 experimentos independentes.

#### 4.7. Produção do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em células controle e XP-C

Em células aeróbicas, a mitocôndria representa um sítio quantitativamente importante de geração de EROs, através do escape de elétrons para o oxigênio molecular nos complexos I e III (Kowaltowski et al., 2009). Uma vez que observamos que células XP-C apresentavam uma taxa de consumo de oxigênio diminuída quando alimentadas com substratos de complexo I, nós hipotetizamos que parte dos elétrons alimentados via esse complexo poderiam estar escapando da CTE, resultando em uma maior produção de EROs. Desta forma, analisamos os níveis de produção de EROs, começando pelo  $O_2^{\cdot-}$ , que é a primeira espécie a ser formada após a transferência de 1 elétron para o  $O_2$ . Os resultados apresentados na **Figura 8** mostram que, na presença de antimicina A (inibidor específico do complexo III da CTE) e DPI (inibidor da NADPH oxidase), havia um aumento significativo na produção de  $O_2^{\cdot-}$ , medida pela oxidação do indicador fluorescente MitoSOX, em células XP-C comparadas às células controle.

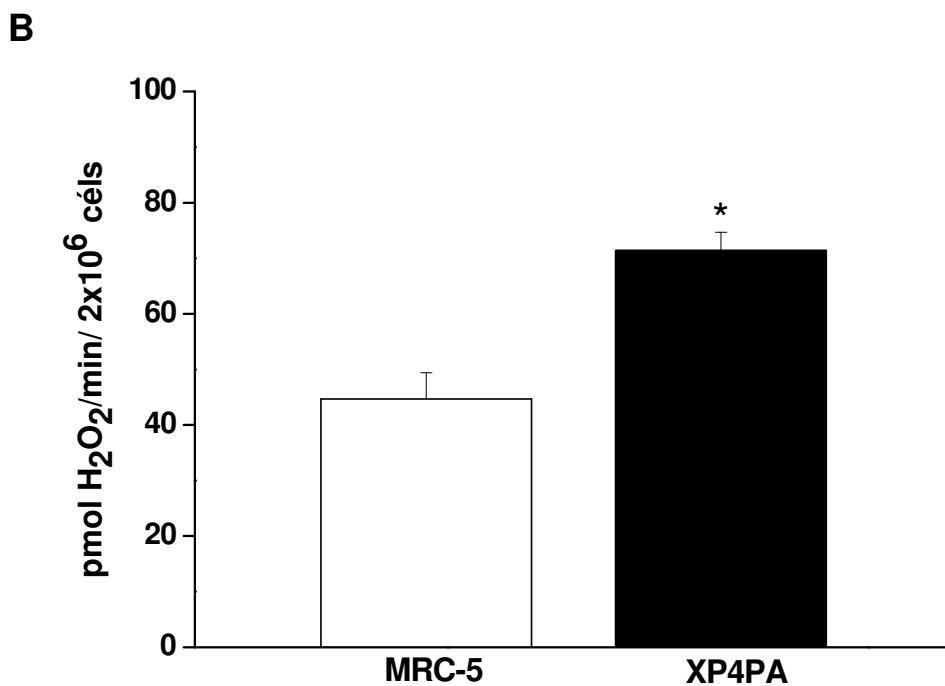
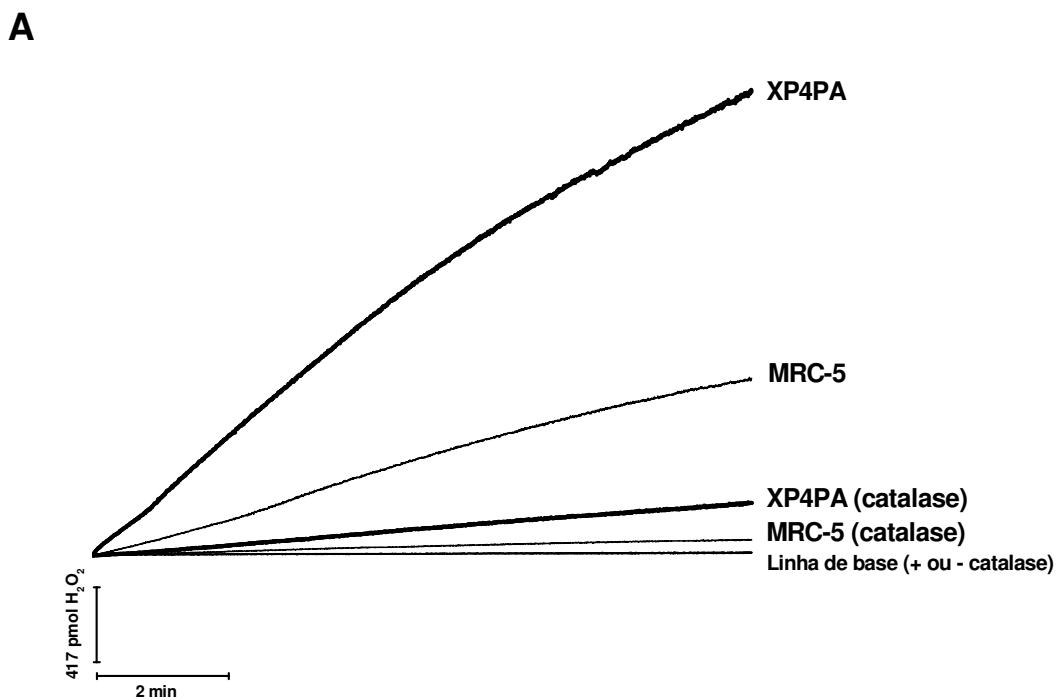




**Figura 8. Produção de radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).** Células controle e XP-C foram tripsinizadas e  $1 \times 10^6$  foram tratadas com  $5 \mu M$  Antimicina A,  $5 \mu M$  DPI e  $5 \mu M$  MitoSOX em  $500 \mu L$  de meio DMEN alta glicose por 30 min. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, canal FL-2. Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=6), considerando significativo\*  $p < 0,05$ .

#### 4.8. Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em células controle e XP-C

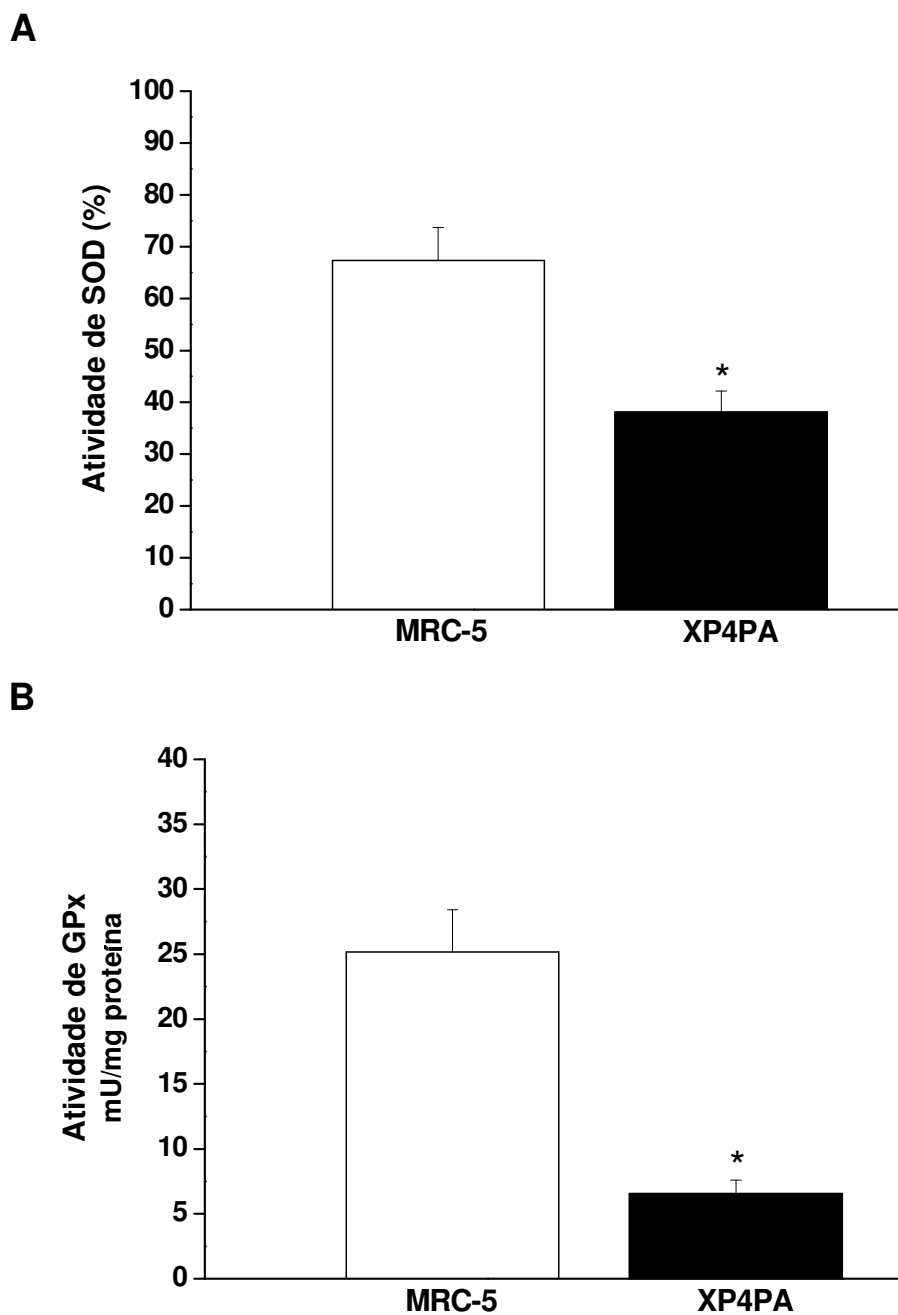
Na matriz mitocondrial, a maioria do  $O_2^{\cdot-}$  produzido é rapidamente dismutado a  $H_2O_2$  pela ação da enzima superóxido dismutase. Portanto, medimos então a produção de  $H_2O_2$  em células intactas, monitorando a oxidação do indicador fluorescente Amplex red<sup>®</sup> ao longo de 10 minutos de incubação (**Figura 9A**). Depois de realizada a calibração com concentrações conhecidas de  $H_2O_2$ , um aumento significativo na taxa de geração de  $H_2O_2$  pôde ser claramente observado na célula XP-C (**Figura 9B**). A adição de catalase foi utilizada para garantir que a espécie reativa sendo formada era  $H_2O_2$ , uma vez que esta degrada  $H_2O_2$  gerando  $H_2O$  e  $O_2$ .



**Figura 9. Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).** Para analisar a produção de  $H_2O_2$ ,  $4 \times 10^6$  foram incubadas na presença de 2 mL de Solução Balanceada de Hank's (HBSS), 10  $\mu$ M Amplex Red, 1 U/mL peroxidase e/ou 5.000 U/mL catalase, com excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente. **Painel A:** Figura representativa. **Painel B:** Taxas de produção de  $H_2O_2$ , calculadas depois da calibração realizada com concentrações conhecidas de  $H_2O_2$  e já descontado o valor com catalase. Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=4), considerando significativo\*  $p < 0,05$ .

#### 4.9. Atividade de enzimas antioxidantes em células controle e XP-C

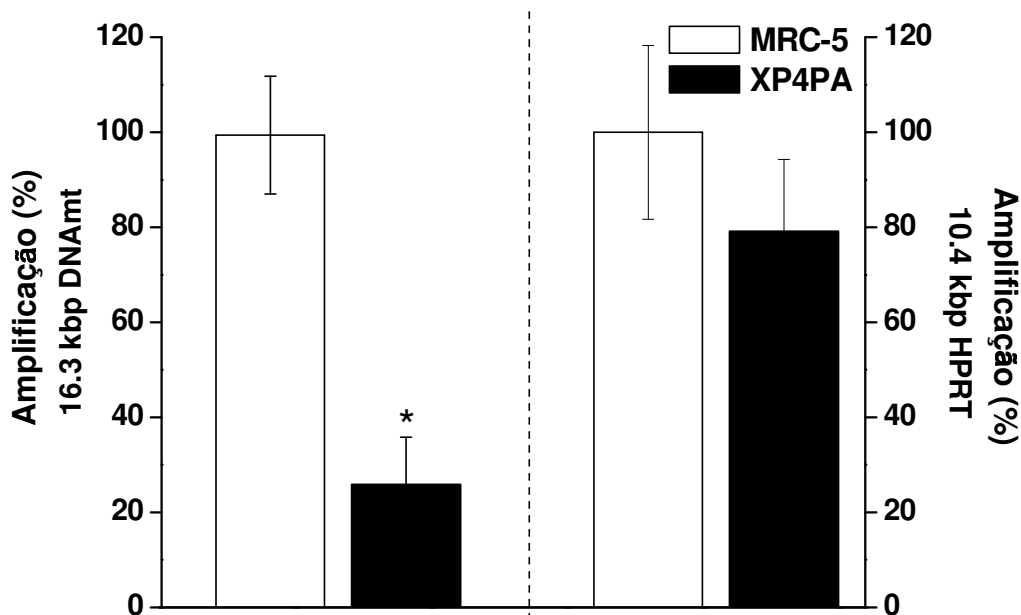
Os resultados apresentados nas figuras 8 e 9 indicaram que células XP-C produzem mais EROs do que células controle. Nessas condições, é comum se observar respostas celulares adaptativas, como um aumento na atividade de enzimas envolvidas na detoxificação dessas espécies (Skulachev, 2013). Portanto, para obtermos um perfil mais completo do balanço redox das células XP-C, nós analisamos a atividade das principais enzimas envolvidas em detoxificação de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  em mitocôndrias, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), respectivamente. Os resultados obtidos indicaram que ambas as enzimas SOD (**Figura 10A**) e GPx (**Figura 10B**) apresentavam atividade reduzida em células XP-C quando comparadas a células normais. Esses resultados sugerem que as células XP-C estão em uma condição de desbalanço redox, ou estresse oxidativo, uma vez que a taxa de produção de EROs está aumentada e a atividade das principais enzimas de detoxificação esta diminuída.



**Figura 10. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathiona Peroxidase (GPx).** **Painel A:** A atividade de SOD foi realizada através do kit Abcam<sup>®</sup> de acordo com as instruções do fabricante. **Painel B:** Para monitorar a atividade de GPx, 100 µg de proteína celular total foi adicionada em 100 mM tampão fosfato dibásico de potássio (pH 7.7), 1 mM EGTA, 1 mM NaNO<sub>3</sub>, 250 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 mM NADPH, 60 mU/mL glutathiona redutase (GR) e 5 mM glutathiona reduzida (GSH). A redução nos valores de absorvância, devido à oxidação do NADPH a NADP<sup>+</sup> foi monitorada a 340 nm em espectrofotômetro termostatizado a 25°C. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=6) para SOD e (n=4) para GPx, considerando significativo\* p<0,05.

#### 4.10. Análise do número de lesões bloqueadoras de polimerases em DNA em células controle e XP-C

Em condições de desbalanço redox mitocondrial, um dos principais alvos do ataque de EROs é o DNAm<sub>t</sub>, uma vez que este se encontra fisicamente associado à face interna da membrana mitocondrial interna, próximo do sítio de geração dessas espécies. Desta forma, nós hipotetizamos que o DNAm<sub>t</sub> de células XP-C deveria acumular um número maior de lesões oxidadas quando comparado ao de células normais, que apresentam taxas de produção de EROs menores. Para testar esta hipótese, nós realizamos o experimento de amplificação relativa de fragmento longo de DNA por XL-PCR que detecta lesões no DNA que estejam bloqueando a progressão da polimerase termoestável da *Thermus thermophilus*. Desta forma, a quantidade de amplificação é inversamente proporcional à quantidade de lesões no DNA. Como mostrado na **Figura 11**, o DNA mitocondrial de células XP-C apresenta um número significativamente maior de lesões do que o de células controle. Por outro lado, o DNA nuclear de ambas as células apresentou níveis similares de lesões bloqueadoras, medidas pela amplificação de um fragmento de 10.4 kb do gene *HPRT*.

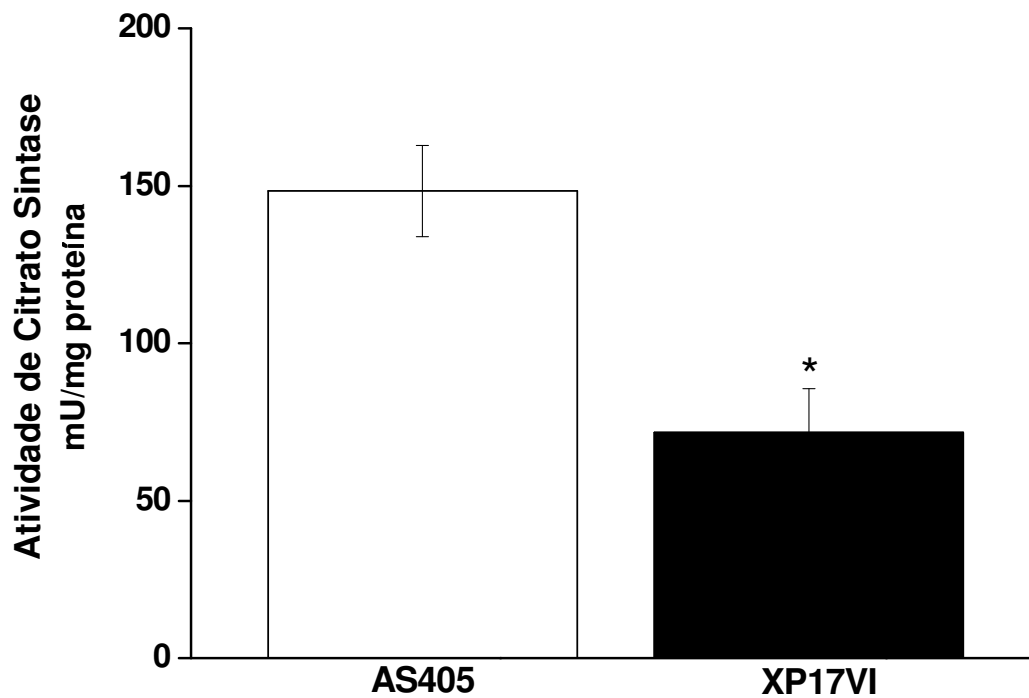


**Figura 11. Medida do número de lesões bloqueadoras de polimerases em DNA por XL-PCR.** A amplificação de um fragmento de 16,3 kbp de DNAMt foi realizada como descrito. A quantidade de DNAMt nas amostras foi ajustada com os valores de  $\Delta\Delta C_t$  *ND1/HPRT* como normalizador. Por sua vez, a amplificação do fragmento de 10,4 kbp de nDNA (*HPRT*) foi normalizada pela média dos Ct de *HPRT* cada linhagem. Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes considerando significativo\*  $p < 0,05$ .

#### 4.11. Atividade enzimática de citrato sintase em células primárias controle e XP-C

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos anteriores (MRC-5 e XP4PA) são oriundas de dois indivíduos diferentes. Portanto, é possível supor que as diferenças no número e função mitocondriais observadas entre as linhagens fosse devido à variações inter-individuais não diretamente relacionadas à presença ou ausência de XPC, que é o objetivo deste estudo. Para testar esta hipótese, nós realizamos experimentos utilizando um outro par de células, obtidos de indivíduos diferentes, e não relacionados aos doadores das linhagens anteriores. Além disso, utilizamos linhagens de fibroblastos primários, não transformados, para eliminar também qualquer efeito relacionado ao processo de

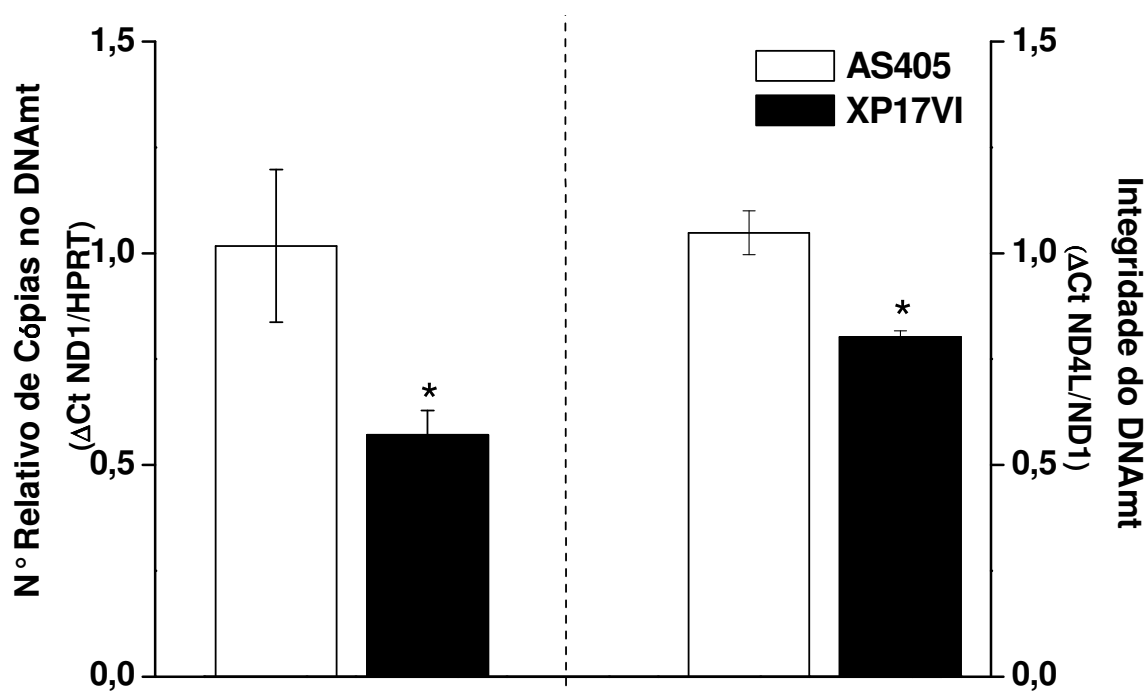
imortalização. Desta forma, experimentos foram realizados utilizando as linhagens AS405 (controle) e XP17VI (XP-C). Inicialmente, medimos a atividade de CS e análogo ao observado para o par de linhagens imortalizadas, células XP-C primárias também possuem menor atividade de citrato sintase (**Figura 12**), sugerindo também um número menor de mitocôndrias nessas células.



**Figura 12. Atividade de citrato sintase em células primárias controle e XP-C.** Em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), a 30°C, foi monitorada, durante 5 minutos (412 nm), a conversão de DTNB a TNB pela enzima citrato sintase. Cerca de 3,0 µg de proteína total da célula foi utilizada para o ensaio. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4), considerando significativo\* p<0,05.

#### 4.12. Número de cópias de DNAmT em células primárias controle e XP-C

Uma vez observado que a atividade de CS estava diminuída, nós realizamos o experimento do número de cópias de DNAmT nas células primárias, e os resultados, apresentados na **Figura 13**, mostraram que células XP-C apresentam menor número de cópias de DNAmT, o que diferiu do observado em células imortalizadas, que não apresentavam diminuição no número de cópias de DNAmT. Por outro lado, a análise de deleções do DNAmT em células primárias revelou também uma amplificação relativa menor da região do gene *ND4L*, indicando um aumento do número de cópias deletadas. Em conjunto com os resultados obtidos com o par MRC5/XP4PA, esses resultados sugerem que as alterações no número de mitocôndrias é, de fato, associada à ausência da proteína XPC, uma vez que esse não é um evento isolado de linhagens celulares.



**Figura 13.** Número de cópias de DNA mitocondrial em células primárias controle e XP-C. Amplificação relativa do gene *ND1* (DNAmT) versus gene *HPRT* (DNA nuclear). Quantificação relativa do gene *ND4L* (frequentemente deletado) versus gene *ND1* (raramente deletado). Os valores Ct foram analisados pelo método  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=4), considerando significativo\* p<0,05.

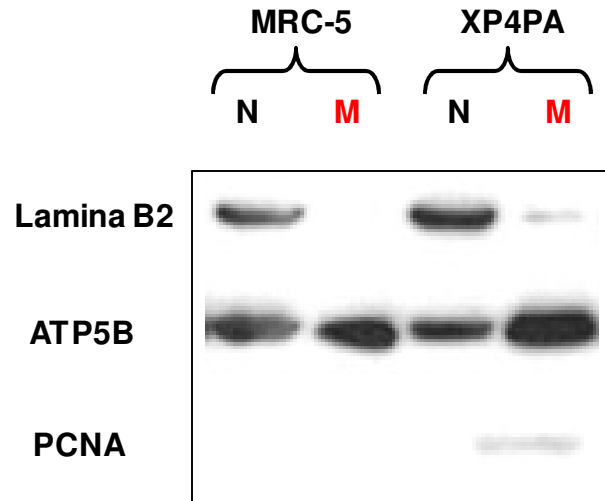


#### 4.13. Localização e expressão de XPC na célula

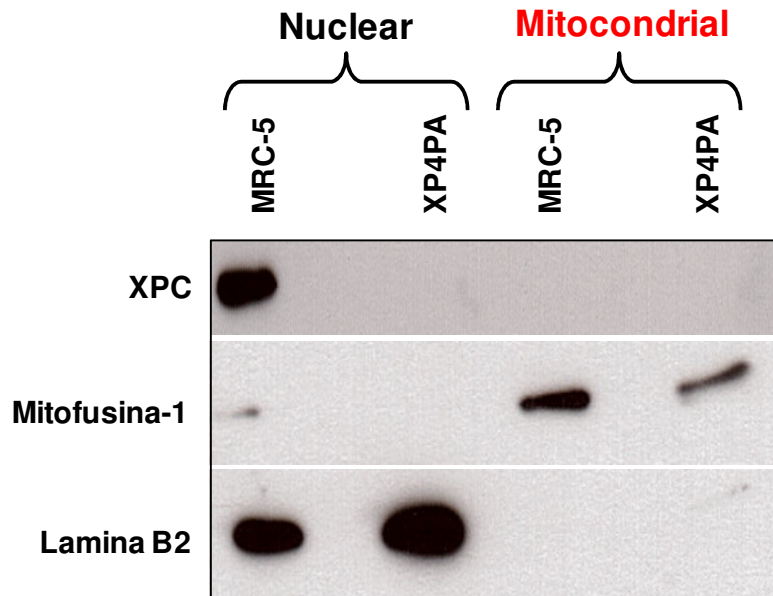
Uma vez que nossos resultados indicaram um papel importante da proteína XPC na manutenção da integridade genômica e funcional da mitocôndria, nós investigamos se esse papel estaria relacionado a alguma função desempenhada pela proteína diretamente na organela. A proteína XPC foi inicialmente identificada como um fator de reconhecimento de lesões em DNA nuclear, e sua localização nuclear já foi claramente demonstrada anteriormente (Sugasawa, 2010). Entretanto, a localização mitocondrial da proteína, essencial para um papel direto na manutenção da integridade da organela, ainda não havia sido demonstrado. Desta forma, investigamos a localização mitocondrial de XPC em MRC-5 e XP4PA utilizando *Western blotting* e imunofluorescência. Para isso, mitocôndrias foram isoladas das duas linhagens, e a pureza das preparações foi verificada por *Western blotting* utilizando lamina B2 e PCNA como marcadores nucleares e ATP5B como marcador mitocondrial. Como observado na **Figura 14A**, as frações mitocondriais obtidas de ambas as linhagens celulares estavam completamente livres de contaminação por proteínas nucleares. Esse alto grau de pureza é essencial para a identificação inequívoca da localização mitocondrial de proteínas que também estão presentes no núcleo, uma vez que uma pequena contaminação da preparação por proteínas nucleares pode resultar em artefatos.

Comprovada a pureza das frações, investigamos a presença de XPC na fração mitocondrial através de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal contra esta proteína. Os resultados apresentados na **Figura 14B** indicam claramente que XPC está localizada somente no núcleo, uma vez que a banda específica de XPC foi identificada apenas na fração nuclear, identificada pela presença de lamina B2, de células MRC-5, mas não na fração mitocondrial, identificada pela presença de mitofusina 1. Este resultado foi também confirmado pela metodologia de imunofluorescência (**Figura 14C**), onde é possível observar a localização de XPC, marcado em vermelho, apenas no núcleo, colocalizando com o sinal azul da fluorescência de DAPI. Nenhuma colocalização com mitocôndrias, marcadas em verde utilizando um anticorpo contra piruvato desidrogenase, foi observada (**Figura 14C, painel merge**). Portanto, nós podemos concluir que XPC promove as alterações observadas através de sinalização e não por ação direta uma vez que ela não está localizada na mitocôndria.

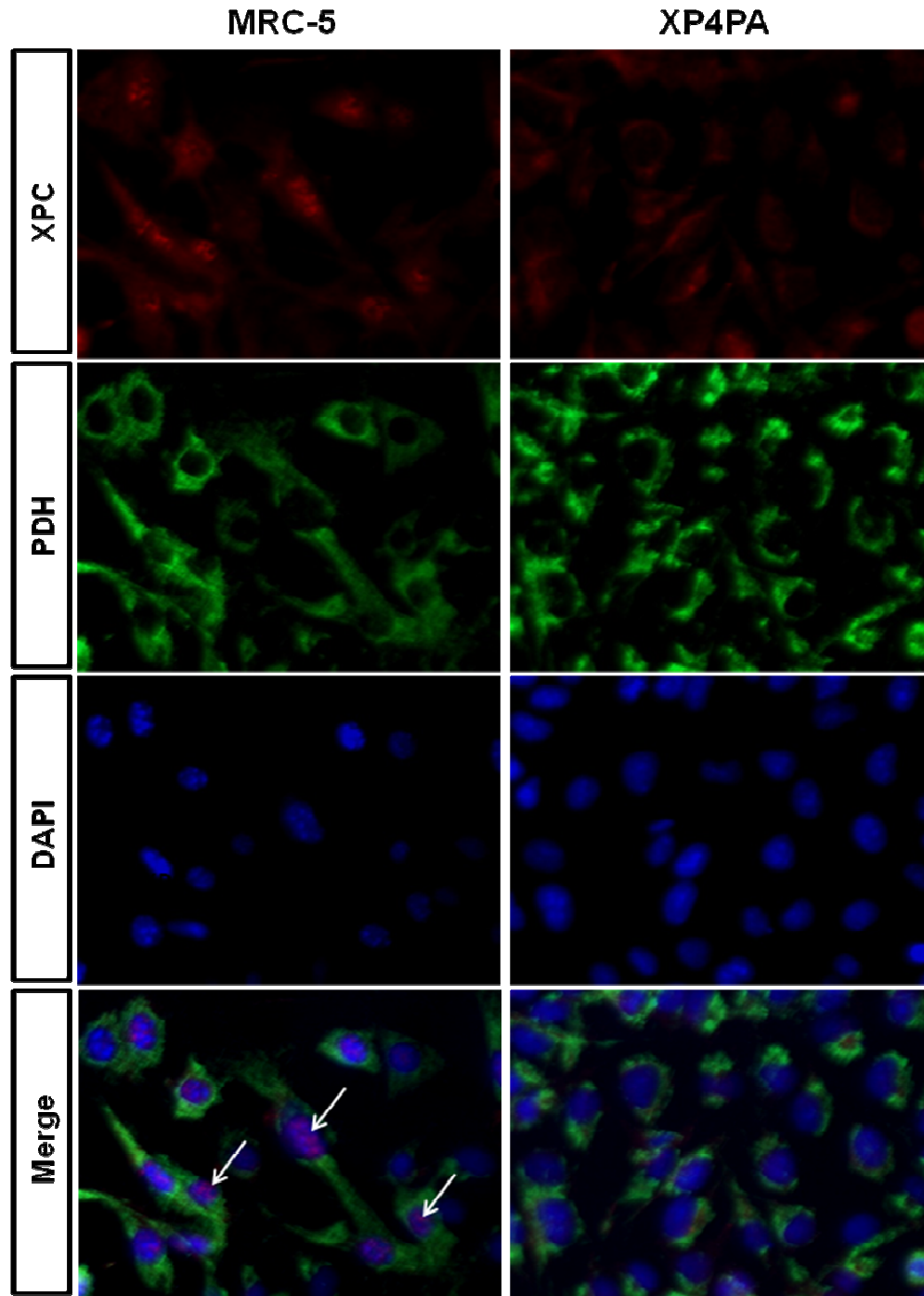
**A**



**B**



C

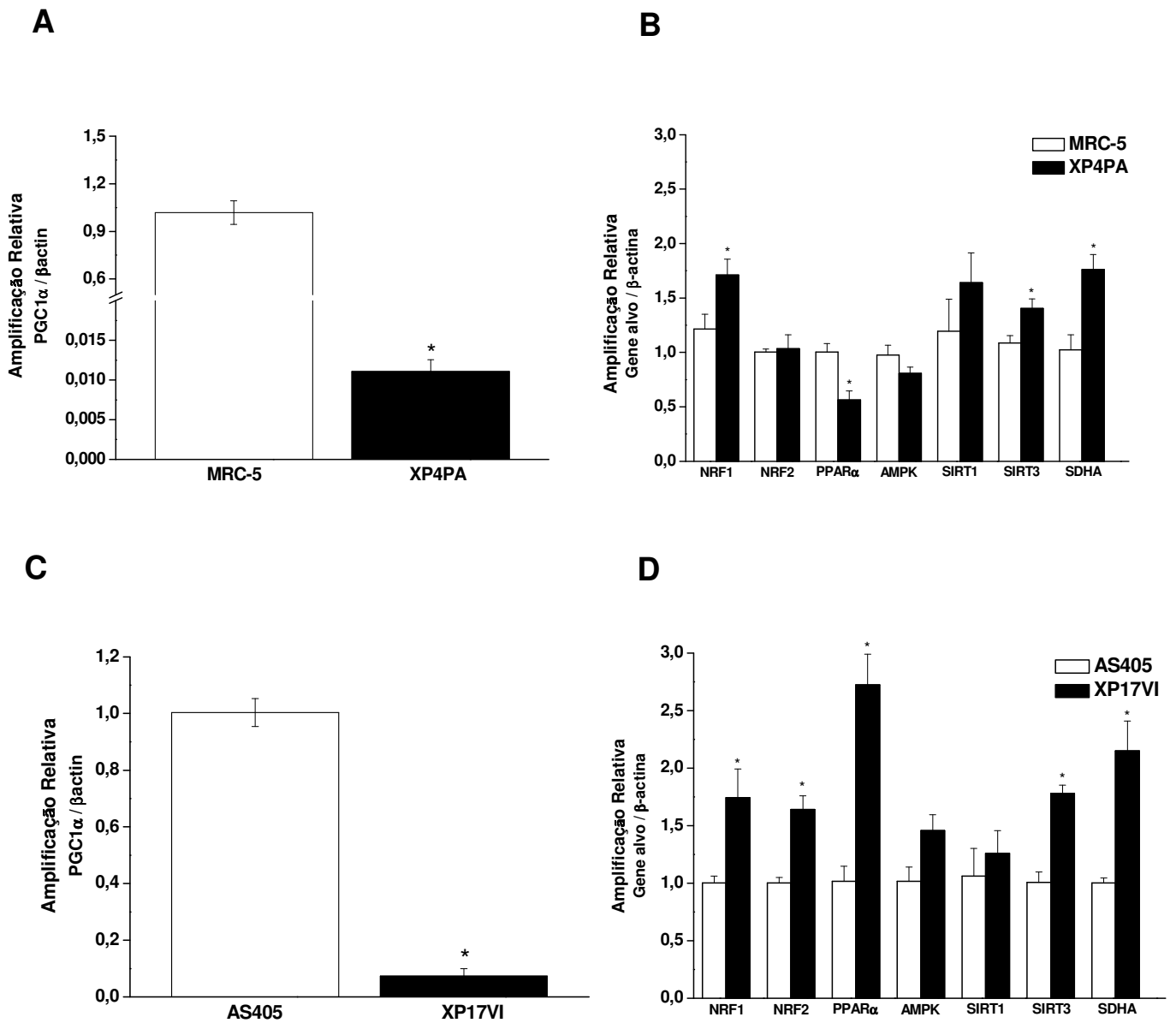


**Figura 14. Expressão e localização da proteína XPC na célula.** (A) *Western blotting* para checar a pureza da fração mitocondrial. Foram usados 10  $\mu$ g de proteína total. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários contra lamina B2, ATP5B e PCNA. O anticorpo secundário usado foi contra IgG-HRP. O sinal de lamina B2 ou PCNA na fração mitocondrial até 5% foi considerado como contaminante aceitável. N – fração nuclear, M – fração mitocondrial. (B) *Western blotting* para verificação da localização intracelular de XPC. Foram usados 40  $\mu$ g de proteína. Anti-XPC, anti-mitofusina1 e anti-lamina B2 foram usados como anticorpos primários. Foram usados anticorpos secundários conjugados à HRP. Experimento típico de três isolamentos independentes. (C) Imagens de imunofluorescência de células incubadas com anti-XPC (vermelho), anti-piruvato desidrogenase (verde) e DAPI (azul). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-*mouse* Alexa 594 e anti-*rabbit* Alexa 488. A presença de XPC no núcleo (pontos lilás) é observada na célula controle. As imagens foram analisadas sob campo microscópico X630 (Zeiss Axio Observer.A1 [Inverted]).

#### 4.14. Análise dos genes envolvidos na biogênese mitocondrial em células controle e XP-C transformadas e primárias

Uma vez que as alterações observadas em células XP-C não decorrem da ação direta da proteína XPC dentro da mitocôndria, nós investigamos se haviam alterações na expressão de genes importantes na sinalização de biogênese mitocondrial. Inicialmente, medimos a expressão de *PGC1 $\alpha$* , uma vez que esse co-ativador transcricional desempenha um papel fundamental no programa de expressão que controla a expressão de genes de proteínas mitocondriais essenciais à replicação do DNAm, como TFAM. Os painéis **A** e **C** da **Figura 15** mostram que a expressão de *PGC1 $\alpha$*  está drasticamente diminuída, tanto em células transformadas (**Figura 15A**) quanto em células primárias (**Figura 15C**), indicando um comprometimento severo no programa de biogênese mitocondrial.

Em vistas desse resultado, nós analisamos a expressão de outros genes relacionados a essa via. *NRF1* e *SIRT3* apresentaram expressão aumentada em células XP-C transformadas (**Figura 15B**). Já os genes *NRF2*, *PPAR $\alpha$* , *AMPK* e *SIRT1* (**Figura 15B**) não apresentaram diferenças. A expressão aumentada de *SDHA*, uma subunidade do complexo II da CTE, corrobora com o resultado de consumo de O<sub>2</sub> do complexo II, onde há maiores taxas de respiração em XP-C (**Figura 15B**). Em células primárias, quase todos os genes analisados, com exceção de *AMPK* e *SIRT1*, mostraram níveis aumentados de expressão em células XP-C (**Figura 15D**). *SDHA* também apresentou maior expressão na célula primária XP-C, sugerindo que a respiração a partir do complexo II pode apresentar perfil semelhante às linhagens celulares (**Figura 15D**). Em conjunto, esses resultados sugerem que células XP-C apresentam alterações significativas no programa de expressão gênica que controla a biogênese mitocondrial e a expressão de genes codificados no DNAm, e que alterações na expressão de *PGC1 $\alpha$*  podem desempenhar um papel fundamental nesse efeito.



**Figura 15. Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial.** A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi analisada por qRT-PCR usando *primers* específicos para os genes *PGC1 $\alpha$* , *NRF1*, *NRF2*, *PPAR $\alpha$* , *AMPK*, *SIRT1*, *SIRT3* e *SDHA*, apresentados na Tabela 2. Quatro extrações de RNA de células MRC-5 e XP4PA (**Painéis A e B**), e AS405 e XP17VI (**Painéis C e D**) foram realizadas. Os resultados apresentados são de dois experimentos independentes em triplicata (n=4). Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n=4), considerando significativo\* p<0,05.



## *5. Discussão*





A manutenção da integridade funcional da mitocôndria é essencial para a homeostase celular. Em células aeróbicas, as mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte do ATP, de forma que a perda de sua integridade funcional pode resultar em um colapso energético nas células. Além de sua função no metabolismo energético, as mitocôndrias também desempenham um papel central na resposta celular ao estresse, uma vez que várias proteínas indutoras de morte celular programada são “armazenadas” na mitocôndria e podem ser liberadas para o citosol, em resposta à sinalização pertinente, dando início ao “programa” que resulta em morte celular (Kroemer e Reed, 2000; Kroemer et al., 2007). Enquanto que alterações mitocondriais foram, inicialmente, associadas apenas à morte celular por apoptose, hoje sabe-se que a mitocôndria participa, direta ou indiretamente, de vários outros tipos de morte celular, como necrose, necroptose e morte por autofagia (Mattson e Kroemer, 2003; Green et al., 2011; Galluzzi et al., 2012). Desta forma, não é surpreendente que disfunção mitocondrial esteja associada a várias patologias humanas de grande impacto em saúde pública, como câncer, doenças metabólicas incluindo diabetes, neurodegeneração assim como o envelhecimento normal (Galluzzi et al., 2012).

Mitocôndrias são também organelas ímpares em células animais, uma vez que são as únicas que contêm seu próprio genoma, um DNA circular que codifica 13 proteínas essenciais de 4 dos 5 complexos da fosforilação oxidativa (revisado em Figueira et al., 2013). Isso implica que a biogênese da organela envolve a expressão coordenada de dois genomas, a tradução e localização adequada das proteínas sintetizadas fora da mitocôndria, além da montagem adequada dos complexos compostos por subunidades codificadas em dois genomas diferentes (Scarpulla et al., 2012). Neste contexto, a manutenção da integridade do genoma mitocondrial é, portanto, também essencial para a sua integridade funcional, uma vez que mutações nas proteínas codificadas no DNAm resultam em perda de atividade dos complexos respiratórios aos quais essas pertencem (Lagouge e Larsson, 2013), além de outras alterações, como o aumento da produção mitocondrial de EROs, e consequente desbalanço redox.

Em seres humanos, mais de 150 mutações patogênicas já foram identificadas no DNAm. Essas mutações causam várias síndromes multisistêmicas, de severidade e idade de acometimento variadas. Devido a essas características, doenças mitocondriais são de difícil diagnóstico, e dados epidemiológicos ainda são muito deficientes. Entretanto,

considerando a alta prevalência de mutações em DNAm<sub>t</sub> na população, estimada entre 1 em 5.000 a 1 em 10.000 (Chinnery et al., 2012), vários autores têm sugerido que doenças mitocondriais podem representar um grupo de grande impacto em saúde pública (Farina e Souza-Pinto, Aspectos fisiopatológicos, epidemiologia, manifestações clínicas e panorama atual dos métodos de diagnóstico e tratamento das doenças mitocondriais. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como requerimento para a conclusão do curso Farmácia-Bioquímica, Nov. 2013). Neste contexto, é fundamental entendermos as vias moleculares envolvidas na manutenção da integridade genômica e funcional da mitocôndria, uma vez que alterações nessas vias podem desempenhar papéis causais na formação de mutações somáticas no DNAm<sub>t</sub>, ou resultar na disfunção bioenergética da organela.

O DNAm<sub>t</sub> está fisicamente associado com a membrana mitocondrial interna, em um complexo núcleo-protéico denominado nucleóide (Lagouge e Larsson, 2013). Sua localização, próxima aos sítios de geração de EROs na CTE, o torna um alvo primário do ataque dessas espécies, resultando no acúmulo preferencial de bases oxidadas e quebras de fita no DNAm<sub>t</sub> quando comparado ao DNA nuclear (Lagouge e Larsson, 2013). Vários autores sugerem que esse acúmulo de lesões oxidadas no DNAm<sub>t</sub> desempenha um papel importante no desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, e de outras condições associadas com a idade (Corral-Debrinski et al., 1992; Ames et al., 1993; Melov et al., 1997; Wallace, 1999); entretanto evidências experimentais diretas para essa relação causal ainda não foram demonstradas. Não obstante, evidências *in vitro* e *in vivo* demonstram que lesões oxidadas podem induzir mutagenese (Wallace et al., 1988; Shoffner et al., 1995; Andersson, et al., 1998), e é provável que estas iniciem a sequência de eventos moleculares que resultem em alterações funcionais da organela.

Em mitocôndrias, lesões oxidadas são reparadas pela via BER, iniciada pela ação de DNA glicosilases (Iyama e Wilson, 2013). Souza-Pinto et al. (2001) demonstraram que, em mitocôndrias de mamíferos, a DNA glicosilase OGG1 é essencial para o reparo de 8-OHdG, uma das bases oxidadas mais abundantemente formadas em DNA, Esta enzima é constitutivamente expressa, mas sua atividade pode ser modulada por modificações pós-traducionais, como fosforilação (Hu et al., 2005), bem como por interações protéicas, como a interação com APE1 (Hill et al, 2001). Dentre as interações protéicas que modulam a

atividade de OGG1, a interação desta com a proteína XPC (D'Errico et al., 2006) é particularmente relevante, uma vez que indica um importante *cross-talk* entre vias de reparo distintas. XPC é responsável pelo reconhecimento de lesões distorcivas em regiões não expressas do genoma nuclear, e inicia o reparo destas, pela via de NER, e mutações no gene *Xpc* causam *xeroderma pigmentosum*, com incidência elevada de cânceres de pele (Niedernhofer et al., 2011). Entretanto, esse *cross-talk* com a via BER pode ter um papel importante na elevada susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, uma vez que pelo menos uma mutação identificada em pacientes XP-C, uma substituição de aminoácido P334H, previne a estimulação de OGG1 por XPC porque impede a interação física entre as duas proteínas.

Como OGG1 é a DNA glicosilase mais importante para o reparo de purinas oxidadas em DNAm (Hu et al., 2005a), e XPC pode representar um regulador importante da atividade desta enzima, nós hipotetizamos que XPC poderia contribuir para a manutenção da integridade do DNAm, e conseqüentemente para a função mitocondrial em células humanas. De fato, Rezvani e colaboradores (2011) demonstraram recentemente que o silenciamento de XPC em queratinócitos, causa alterações metabólicas, com uma mudança de metabolismo aeróbico para metabolismo glicolítico, e que essas alterações dirigem a formação de carcinomas de células escamosas. Nesse trabalho e no estudo subsequente (Rezvani et al., 2011), os autores sugerem que o acúmulo de lesões não reparadas no DNA nuclear de células com a expressão de XPC silenciada, causa alterações metabólicas via a ativação da kinase AKT1 e de NADPH oxidase, aumentando a geração de EROs. Entretanto, nesses estudos, alterações bioenergéticas da mitocôndria não foram adequadamente investigadas.

Portanto, neste trabalho, nós investigamos a função mitocondrial de células XP-C, tanto primárias quanto imortalizadas, para garantir que eventuais disfunções mitocondriais encontradas, não resultaram do processo de imortalização. De fato, a superexpressão de RNAs específicos localizados na região do *D-loop* do DNAm foram identificados durante o processo de imortalização celular (Duncan et al., 2000; Perrem e Reddel, 2000); e a imortalização celular através da superexpressão de hTERT induz uma diminuição no consumo de O<sub>2</sub> e na síntese de ATP (Auré et al., 2007). Entretanto, em linhas gerais, os resultados obtidos aqui foram semelhantes para o par de linhagens imortalizadas como para

o par de linhagens primárias. Desta forma, concluímos que as alterações observadas não decorreram do processo de imortalização.

Além disso, como as linhagens normal e deficiente em XPC, em ambos os pares, foram obtidas de indivíduos diferentes, era possível que variações inter-individuais, decorrentes de outras diferenças genéticas entre os indivíduos, contribuíssem para possíveis diferenças encontradas. Isso poderia confundir a interpretação dos resultados, fazendo com que efeitos não relacionados à ausência de XPC fossem atribuídos a essa. Novamente, os resultados similares observados entre os dois pares indicam que as alterações mitocondriais são diretamente relacionadas à ausência de XPC, e indicam um efeito causal. Nós estamos, agora, trabalhando na complementação genética das células XP4PA com um vetor contendo o gene *Xpc* normal, para comprovar experimentalmente essa relação causal (Mori e Souza-Pinto, resultados não publicados).

Neste estudo, nós detectamos importantes alterações bioenergéticas em células XP-C, a começar por uma diminuição significativa no conteúdo mitocondrial nessas células, demonstrado tanto pela diminuição na atividade de CS (**Figuras 1 e 12**), quanto pela diminuição no número de cópias do DNAm<sub>t</sub>, em células primárias (**Figura 13**). Em células XP-C transformadas, por outro lado, o número de cópias de DNAm<sub>t</sub> não foi alterado, mesmo com uma diminuição de cerca de 50% na atividade de CS. Como a atividade dessa enzima é um marcador para número de mitocôndrias (Booth e Kirby, 1991), é possível que esse efeito seja uma resposta compensatória ao aumento de deleções e lesões observados nas células deficientes em XPC (**Figuras 2 e 11**, respectivamente). De fato, um efeito similar foi observado em um modelo de retinopatia diabética em ratos, em que o número de cópias do DNAm<sub>t</sub> aumentou significativamente nos estágios iniciais da doença, em resposta ao estresse oxidativo provocado (Santos et al. 2012; Tewari e Kowluru, 2012). Vale ressaltar que células XP-C também apresentaram um significativo desbalanço redox, com aumento na geração de EROs, e uma diminuição significativa na atividade das duas principais enzimas antioxidantes mitocondriais, a SOD e a GPx (**Figura 10A e 10B**). Além disso, em células HeLa, a ativação do *checkpoint* ATM/Chk2, um modulador central da resposta à lesões no DNA, também resultou em um aumento do número de cópias de DNAm<sub>t</sub>, bem como em um aumento nos níveis de uma deleção de 4977 pb, conhecida como *common deletion* (Niu et al., 2012).

A diminuição no conteúdo mitocondrial em células XP-C resulta em uma maior susceptibilidade à permeabilização induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 6A**), que é revertida quando o dobro de células XP-C (relativo ao número de células normais) é utilizado no ensaio (**Figura 7A**). Isso sugere que esse efeito é devido, em grande parte, à concentração relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  à qual as mitocôndrias são expostas na célula XP-C, e não a um defeito intrínseco na captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ . Entretanto, no contexto celular, a diminuição do número de mitocôndrias em células XP-C pode ter um efeito muito importante para a homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que essas organelas participam ativamente da manutenção da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  livre nos níveis fisiológicos, de cerca de 100 nM, mas que pode atingir até 10  $\mu\text{M}$  em resposta a vários estímulos. Apesar de a atividade do transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  *uniporter* (MCU) variar significativamente entre tipos celulares quanto à sua capacidade de captar esse íon (Fieni et al., 2012), a concentração intra-mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  controle a produção de ATP e a permeabilização da membrana mitocondrial durante a resposta apoptótica (Gunter & Gunter, 2001). Desta forma, alterações na capacidade da célula em controlar a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  livre poderiam resultar em alterações metabólicas, com diminuição na produção de ATP.

A proteína centrina 2 (caltractina) é um fator que desempenha um papel regulador importante durante os estágios iniciais, de reconhecimento da lesão, da via de NER. Esta proteína é uma proteína ligante de  $\text{Ca}^{2+}$ , da família EF-hand, que forma um complexo estável com XPC (Araki et al., 2001), em uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Popescu et al., 2004). Com isso, alterações na homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  poderiam resultar, adicionalmente, em mudanças nas atividades de reparo de XPC, contribuindo para o acúmulo de lesões no DNA nuclear e a ativação de vias de sinalização, como a via de AKT1, como proposto por Rezvani et al. (2011).

Outro efeito bioenergético importante observado em células XPC foi a inibição da respiração mitocondrial via complexo I (**Figura 3A**), enquanto que complexo II apresentou atividade (**Figura 5A e 5B**) e expressão (**Figura 15D**) aumentadas. Em seres humanos, o complexo I, ou NADH desidrogenase, é constituído por 45 subunidades (genenames.org), das quais 7 são codificadas no DNAm (mitomap.org). A montagem do complexo I na haloenzima madura envolve a expressão coordenada dos dois genomas, além de um vasto grupo de proteínas conhecidas como “fatores de montagem” (Mckenzi e Ryan, 2010).

Mutações tanto em genes de proteínas estruturais e/ou catalíticas, assim como nos fatores de montagem resultam em perda de atividade do complexo (Taylor e Turnbull, 2005). Mesmo quando a atividade catalítica é preservada, como no caso da neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON), causada por uma de três mutações em genes mitocondriais do complexo I, observa-se um aumento de sensibilidade a inibidores do complexo I e uma deficiência respiratória mitocondrial, associada a um aumento na produção de EROs (Lenaz et al., 2004). No caso de células XP-C, também observamos uma diminuição no controle respiratório usando substratos de complexo I e um aumento na produção de  $O_2^{\cdot-}$  e de  $H_2O_2$  (**Figura 8 e Figura 9A e B**). Além disso, esse aumento na produção de EROs foi acompanhado por uma diminuição significativa na atividade das duas principais enzimas de detoxificação dessas espécies, SOD e GPx, respectivamente (**Figura 10A e B**).

Essas observações sugerem que as mitocôndrias das células XP-C estão em uma condição de estresse oxidativo crônico, que resultaria na oxidação de biomoléculas mitocondriais. E, de fato, detectamos mais lesões bloqueadoras de polimerases em DNAmT de células XP-C do que em células controle (**Figura 11**), além de um aumento no número de moléculas deletadas (**Figura 2 e Figura 13**). E, apesar de não termos medido o número de mutações em DNAmT especificamente, esses resultados sugerem que o DNAmT de células XP-C deva carregar um número maior de mutações do que o de células normais. Desta forma, se estabeleceria um círculo vicioso, em que a atividade comprometida do complexo I, por mutações no DNAmT, causaria um aumento na produção de EROs, que por sua vez causariam ainda mais lesões em biomoléculas mitocondriais, inclusive no próprio DNAmT. Vários autores propõem que esse acúmulo de lesões e mutações em DNAmT tem um papel importante no processo tumorigênico, inclusive em câncer de pele associado a exposição à UV (Birch-Machin et al., 2013), que é o principal tipo de câncer observado em pacientes XP-C. Entretanto, resultados recentes de sequenciamento em larga escala de genomas mitocondriais individuais em câncer colorretal encontraram menos mutações no DNAmT das amostras de câncer comparadas às amostras normais (Ercison et al., 2012). Esses autores sugerem que a mudança de metabolismo aeróbico para glicolítico durante a progressão tumoral diminui a geração de EROs, e “protege” o DNAmT de mutagênese induzida por essas espécies. Entretanto, eles não descartam a possibilidade de que mutações primárias no DNAmT contribuam para a mudança metabólica observada durante o processo.

Por outro lado, nós observamos um aumento da atividade do complexo II em células XP-C, provavelmente como resposta compensatória à disfunção observada no complexo I (**Figura 5A e B**). O complexo II, ou succinato desidrogenase, é composto por 4 subunidades proteicas, todas codificadas no DNA nuclear (genenames.org). A expressão da subunidade SDHA do complexo II é regulada diretamente pelo fator de transcrição NRF-1 (de *nuclear respiratory factor 1*), um dos fatores transcricionais que coordenam a expressão de genes mitocondriais em resposta a estímulos ambientais e intracelulares (revisado em Scarpulla, 2012). Esse fator, em conjunto com NRF-2, ERR $\alpha$ , CREB e YY1 e com os co-ativadores da família PGC-1 (PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$  e PRC), funciona como um sensor intracelular do status metabólico da célula, e induz a expressão de proteínas mitocondriais codificadas no núcleo em condições de alta demanda metabólica, mediando termogênese, proliferação celular e gliconeogênese (Scarpulla, 2012). Desta forma, é possível imaginar um cenário, em células XP-C, em que a diminuição na respiração mediada pelo complexo I e consequente queda na concentração intracelular de ATP ativem um programa de sinalização intracelular que culmine na expressão aumentada das subunidades do complexo II. E, de fato, nós observamos maior expressão de SDHA e NRF1 tanto em células XP-C primárias quanto transformadas (**Figura 15B e D**).

Além disso, a atividade de succinato desidrogenase é diretamente controlada por SIRT3, especificamente através de sua atividade desacetilase de lisinas da subunidade SDHA (Cimen et al., 2010). Coincidentemente, a expressão de SIRT3 também está elevada em células XP-C (**Figura 15B e D**), reforçando a idéia de que um programa compensatório está em ação nessas células.

Por outro lado, nós observamos uma diminuição bastante significativa na expressão de PGC1 $\alpha$  em células XP-C (**Figura 15A e C**). Esse co-ativador transcricional é considerado um regulador central do programa de biogênese mitocondrial, uma vez que sua ativação induz fortemente a expressão coordenada de genes que estimulam a fosforilação oxidativa (Puigserver e Spiegelman, 2003), além de controlar um programa de expressão gênica em resposta ao estresse oxidativo (St-Pierre et al., 2006). Desta forma, a expressão diminuída de PGC1 $\alpha$  em células XP-C poderia explicar o menor número de mitocôndrias, menor número de cópias de DNAm em células XP-C primárias, e a diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx. Essa observação, no entanto, é difícil de conciliar com a

expressão elevada dos outros reguladores de biogênese mitocondrial, como NRF1 e NRF2, e de SIRT3, uma vez que a expressão desses fatores é também controlada por PGC1 $\alpha$ . Por outro lado, os outros membros da família PGC, PGC1 $\beta$  e PRC, possuem redundância de sítios de ligação com PGC1 $\alpha$  e podem compensar sua ausência. De fato, camundongos com uma deleção direcionado do gene *Pgc1a* são viáveis, e apresentam mitocôndrias morfológicamente normais em tecido cardíaco, apesar de corações isolados desses animais apresentarem uma capacidade funcional diminuída em resposta a estímulos químicos ou elétricos (Arany et al., 2005). Como nós não avaliamos a expressão dos outros membros da família PGC1, é possível que uma adaptação metabólica, com super-expressão desses, esteja compensando pela expressão diminuída de PGC1 $\alpha$  em células XP-C. Em conjunto, nossos dados indicam uma disfunção mitocondrial em células XPC, devido, em grande parte, a uma inibição da atividade do complexo I. Essa inibição é parcialmente complementada por uma super-expressão do complexo II; mas, no entanto, ainda resulta em um desbalanço redox mitocondrial e ao acúmulo de lesões e deleções no DNAm. A análise de expressão de genes envolvidos em biogênese mitocondrial sugere que essa inibição do complexo I é causada pela diminuição da expressão de PGC1 $\alpha$ , que coordena a expressão de outros genes envolvidos em replicação e expressão do DNAm, como TFAM. Como o complexo I é o complexo da CTE com o maior número de unidades codificadas pelo DNAm, não é surpreendente que o efeito da diminuição da expressão de PGC1 $\alpha$  seja mais visível neste complexo em específico.

Além disso, é bastante provável que essas alterações identificadas aqui contribuam significativamente para a tumorigênese observada em pacientes XP-C, uma vez que alterações do número de cópias do DNAm assim com desbalanço redox são, frequentemente associados a iniciação e promoção de tumores.

A questão mais relevante agora é como a falta de XPC causa essa diminuição tão significativa na expressão de PGC1 $\alpha$ . Recentemente, um papel direto para XPC em transcrição, independente de sua função em reparo de DNA, foi proposto por Le May e colaboradores. No modelo proposto por esses autores, mesmo na ausência de danos induzidos ao DNA, proteínas da via de NER, como XPF, XPA e RPA, são ativamente recrutadas para regiões promotoras de genes ativamente transcritos, em uma maneira dependente de XPC, mas não de CSB. Esse complexo é distinto de um "complexo de



reparo", cuja montagem, em regiões distais ao promotor, requer CSB (Le May et. al., 2010). Assim, é possível que XPC funcione como um ativador transcricional de reguladores centrais do programa de biogênese mitocondrial. Essa hipótese será testada em nosso grupo.



## *6. Conclusões*



- A atividade do complexo I da CTE é diminuída em células XP-C, enquanto a atividade dos demais complexos é aumentada,
- Células XP-C apresentam um desbalanço redox mitocondrial, uma vez que produzem mais EROs ( $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$ ) e apresentam deficiência no sistema antioxidante (SOD e GPx);
- Células XP-C possuem o DNA nuclear intacto, porém DNAm mais lesionado;
- A expressão de PGC1 $\alpha$  em células XP-C está significativamente diminuída em células transformadas e primárias;
- As alterações bioenergéticas e de expressão gênica causadas pela ausência de XPC são via sinalização e não por ação direta da proteína, que, em condições basais, não está localizada nesta organela.



## *7. Referências Bibliográficas*





Ames, B. N., M. K. Shigenaga, *et al.* Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.17, Sep 1, p.7915-22. 1993.

Andersson, S. G., A. Zomorodipour, *et al.* The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature, v.396, n.6707, Nov 12, p.133-40. 1998.

Andressoo, J. O., J. H. Hoeijmakers, *et al.* Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing. Adv Exp Med Biol, v.570, p.45-83. 2005.

Araki, T., R. Nagarajan, *et al.* Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel gene discovery. J Biol Chem, v.276, n.36, Sep 7, p.34131-41. 2001.

Arany, Z., H. He, *et al.* Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. Cell Metab, v.1, n.4, Apr, p.259-71. 2005.

Araujo, S. J., F. Tirode, *et al.* Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. Genes Dev, v.14, n.3, Feb 1, p.349-59. 2000.

Aure, K., K. Mamchaoui, *et al.* Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. Neuromuscul Disord, v.17, n.5, May, p.368-75. 2007.

Belló-Klein, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Marroni, N.P. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. CANOAS: Ed. ULBRA, p.15-19. 2002.

Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? Front Physiol, v.4, p.95. 2013.

Bianchi, M. L. P. A., L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev Nutr, v.12. 1999.

Birch-Machin, M. A., E. V. Russell, *et al.* Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. Br J Dermatol, v.169 Suppl 2, Jul, p.9-14. 2013.

Bohgaki, T., M. Bohgaki, *et al.* DNA double-strand break signaling and human disorders. Genome Integr, v.1, n.1, p.15. 2010.

Booth, F. W. e C. R. Kirby. Control of gene expression in adult skeletal muscle by changes in the inherent level of contractile activity. Biochem Soc Trans, v.19, n.2, Apr, p.374-8. 1991.

Bradford, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-254. 1976.

Brooks, P. J. The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous DNA lesions that cause neurodegeneration in xeroderma pigmentosum. Neuroscience, v.145, n.4, Apr 14, p.1407-17. 2007.

Brooks, P. J., T. F. Cheng, *et al.* Do all of the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations result from the accumulation of DNA damage? DNA Repair (Amst), v.7, n.6, Jun 1, p.834-48. 2008.

Brown, M. D. L., M.T. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Churchill Livingstone, London, v.1, p.227-332. 1996.

Camenisch, U., R. Dip, *et al.* Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair. Nat Struct Mol Biol, v.13, n.3, Mar, p.278-84. 2006.

Canto, C., Z. Gerhart-Hines, *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. Nature, v.458, n.7241, Apr 23, p.1056-60. 2009.

Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. Annu Rev Biochem, v.56, p.395-433. 1987.

Casari, G., M. De Fusco, *et al.* Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. Cell, v.93, n.6, Jun 12, p.973-83. 1998.

Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, *et al.* The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr, v.28, n.6, Dec, p.523-9. 1996.

Cerqueira, F. M. M., M.H.G.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Química Nova, v.30, p.441-449. 2007.

Cheadle, J. P. e J. R. Sampson. MUTYH-associated polyposis--from defect in base excision repair to clinical genetic testing. DNA Repair (Amst), v.6, n.3, Mar 1, p.274-9. 2007.

Chinnery, P. F., H. R. Elliott, *et al.* Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. Int J Epidemiol, v.41, n.1, Feb, p.177-87. 2012.

Cimen, H., M. J. Han, *et al.* Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. Biochemistry, v.49, n.2, Jan 19, p.304-11. 2010.

Clayton, D. A., J. N. Doda, *et al.* The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A, v.71, n.7, Jul, p.2777-81. 1974.

Cleaver, J. E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature, v.218, n.5142, May 18, p.652-6. 1968.

Coin, F., V. Oksenych, *et al.* Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. Mol Cell, v.26, n.2, Apr 27, p.245-56. 2007.

Coin, F, *et al.* Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. Mol Cell, v.31, n.1, Jul 11, p.9-20. 2008.

Collins, S. e T. Meyer. Cell biology: A sensor for calcium uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.283. 2010.

Corral-Debrinski, M., T. Horton, *et al.* Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. Nat Genet, v.2, n.4, Dec, p.324-9. 1992.

Croteau, D. L., M. J. Dellavecchia, *et al.* Cooperative damage recognition by UvrA and UvrB: identification of UvrA residues that mediate DNA binding. DNA Repair (Amst), v.7, n.3, Mar 1, p.392-404. 2008.

Croteau, D. L., R. H. Stierum, *et al.* Mitochondrial DNA repair pathways. Mutat Res, v.434, n.3, Jul 30, p.137-48. 1999.

Damas, J., J. Carneiro, *et al.* Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations. Nucleic Acids Res, v.40, n.16, Sep, p.7606-21. 2012.

D'amours, D. e S. P. Jackson. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.5, May, p.317-27. 2002.

Dawson, V. L. e T. M. Dawson. Free radicals and neuronal cell death. Cell Death Differ, v.3, n.1, Jan, p.71-8. 1996.

Delacote, F. e B. S. Lopez. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. Cell Cycle, v.7, n.1, Jan 1, p.33-8. 2008.

Denchi, E. L. e T. De Lange. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. Nature, v.448, n.7157, Aug 30, p.1068-71. 2007.

Deng, Y., X. Guo, *et al.* Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. Nature, v.460, n.7257, Aug 13, p.914-8. 2009.

D'errico, M., E. Parlanti, *et al.* New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. EMBO J, v.25, n.18, Sep 20, p.4305-15. 2006.

Dhar, S. S., S. Ongwijitwat, *et al.* Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. J Biol Chem, v.283, n.6, Feb 8, p.3120-9. 2008.

Diderich, K., M. Alanazi, *et al.* Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. DNA Repair (Amst), v.10, n.7, Jul 15, p.772-80. 2011.

Difilippantonio, M. J., S. Petersen, *et al.* Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. J Exp Med, v.196, n.4, Aug 19, p.469-80. 2002.

Dizdaroglu, M., P. Jaruga, *et al.* Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med, v.32, n.11, Jun 1, p.1102-15. 2002.

Donmez, G. e L. Guarente. Aging and disease: connections to sirtuins. Aging Cell, v.9, n.2, Apr, p.285-90. 2010.

Donohoe, M. E., X. Zhang, *et al.* Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. Mol Cell Biol, v.19, n.10, Oct, p.7237-44. 1999.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, v.82, n.1, Jan, p.47-95. 2002.

Duncan, E. L., R. Wadhwa, *et al.* Senescence and immortalization of human cells. Biogerontology, v.1, n.2, p.103-21. 2000.

Egan, D. F., D. B. Shackelford, *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science, v.331, n.6016, Jan 28, p.456-61. 2011.

Endres, M., D. Biniszkiwicz, *et al.* Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase. J Clin Invest, v.113, n.12, Jun, p.1711-21. 2004.

Ericson, N. G., M. Kulawiec, *et al.* Decreased mitochondrial DNA mutagenesis in human colorectal cancer. PLoS Genet, v.8, n.6, p.e1002689. 2012.

Evans, E., J. G. Moggs, *et al.* Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. EMBO J, v.16, n.21, Nov 3, p.6559-73. 1997.

Fagbemi, A. F., B. Orelli, *et al.* Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. DNA Repair (Amst), v.10, n.7, Jul 15, p.722-9. 2011.

Fagian, M. M., L. Pereira-Da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. J Biol Chem, v.265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.

Fariss, M. W., C. B. Chan, *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Mol Interv, v.5, n.2, Apr, p.94-111. 2005.

Ferreira, A. L. A. M., L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil, v.43, p.61-68. 1997.

Fieni, F., S. B. Lee, *et al.* Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. Nat Commun, v.3, p.1317. 2012.

Figueira, T. R., M. H. Barros, *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid Redox Signal, v.18, n.16, Jun 1, p.2029-74. 2013.

Fousteri, M., W. Vermeulen, *et al.* Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. Mol Cell, v.23, n.4, Aug, p.471-82. 2006.

Galluzzi, L., O. Kepp, *et al.* Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. Circ Res, v.111, n.9, Oct 12, p.1198-207. 2012.

Galluzzi, L., I. Vitale, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ, v.19, n.1, Jan, p.107-20. 2012.

Gerhart-Hines, Z., J. T. Rodgers, *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. EMBO J, v.26, n.7, Apr 4, p.1913-23. 2007.

Giorgio, V., S. Von Stockum, *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc Natl Acad Sci U S A, v.110, n.15, Apr 9, p.5887-92. 2013.

Gredilla, R., L. Weissman, *et al.* Mitochondrial base excision repair in mouse synaptosomes during normal aging and in a model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, v.33, n.4, Apr, p.694-707. 2012.

Green, D. R., L. Galluzzi, *et al.* Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. Science, v.333, n.6046, Aug 26, p.1109-12. 2011.

Gunter, K. K. e T. E. Gunter. Transport of calcium by mitochondria. J Bioenerg Biomembr, v.26, n.5, Oct, p.471-85. 1994.

Gunter, T. E. e K. K. Gunter. Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. IUBMB Life, v.52, n.3-5, Sep-Nov, p.197-204. 2001.

Guo, X., Y. Deng, *et al.* Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. EMBO J, v.26, n.22, Nov 14, p.4709-19. 2007.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. Mol Cell, v.30, n.2, Apr 25, p.214-26. 2008.

Habano, W., T. Sugai, *et al.* Mismatch repair deficiency leads to a unique mode of colorectal tumorigenesis characterized by intratumoral heterogeneity. Oncogene, v.16, n.10, Mar 12, p.1259-65. 1998.

Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. J Neurochem, v.69, n.3, Sep, p.1330-1. 1997.

Harper, M. E., L. Bevilacqua, *et al.* Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. Acta Physiol Scand, v.182, n.4, Dec, p.321-31. 2004.

He, L. e J. J. Lemasters. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? FEBS Lett, v.512, n.1-3, Feb 13, p.1-7. 2002.

Hebra F, K. M. On disease of the skin including exanthemata. New Sydenham Soc, v.61, p.252-258. 1874.

Hill, J. W., T. K. Hazra, *et al.* Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. Nucleic Acids Res, v.29, n.2, Jan 15, p.430-8. 2001.

Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, v.411, n.6835, May 17, p.366-74. 2001.

Hoeijmakers, J. H. DNA damage, aging, and cancer. N Engl J Med, v.361, n.15, Oct 8, p.1475-85. 2009.

Hollander, M. C., R. T. Philburn, *et al.* Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.37, Sep 13, p.13200-5. 2005.

Horton, T. M., J. A. Petros, *et al.* Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, v.15, n.2, Feb, p.95-101. 1996.

Hu, Y. C. e S. A. Ahrendt. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and G:C-to-T:A mutations: no evidence for a role in tobacco-related non small cell lung cancer. Int J Cancer, v.114, n.3, Apr 10, p.387-93. 2005.

Hunter, D. R. e R. A. Haworth. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch Biochem Biophys, v.195, n.2, Jul, p.453-9. 1979.

Hunter, D. R., R. A. Haworth, *et al.* Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem, v.251, n.16, Aug 25, p.5069-77. 1976.

Huo, L. e R. C. Scarpulla. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. Mol Cell Biol, v.21, n.2, Jan, p.644-54. 2001.

Iida, T., A. Furuta, *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol, v.103, n.1, Jan, p.20-5. 2002.

Imai, K., G. Slupphaug, *et al.* Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. Nat Immunol, v.4, n.10, Oct, p.1023-8. 2003.

Inoki, K., T. Zhu, *et al.* TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell, v.115, n.5, Nov 26, p.577-90. 2003.

Iwabu, M., T. Yamauchi, *et al.* Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature, v.464, n.7293, Apr 29, p.1313-9. 2010.

Iyama, T. e D. M. Wilson, 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair (Amst), May 16. 2013.

Jackson, S. P. e J. Bartek. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature, v.461, n.7267, Oct 22, p.1071-8. 2009.

Jager, S., C. Handschin, *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.29, Jul 17, p.12017-22. 2007.

Jun, A. S., M. D. Brown, *et al.* A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.13, Jun 21, p.6206-10. 1994.

Kaposi M. Xeroderma pigmentosa. Ann Dermatol Venereol, v.4, p.29-38. 1883.

Kelly, D. P. e R. C. Scarpulla. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. Genes Dev, v.18, n.4, Feb 15, p.357-68. 2004.

Kim, J., M. Kundu, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol, v.13, n.2, Feb, p.132-41. 2011.

King H, H. C. Xeroderma pigmentosum in a Negress. Arch Dermatol, v.42, p.570-575. 1940.

Koop, D. R. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. Alcohol Res Health, v.29, n.4, p.274-80. 2006.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, Apr 20, p.12-5. 2001.

Kowaltowski, A. J., N. C. De Souza-Pinto, *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med, v.47, n.4, Aug 15, p.333-43. 2009.

Kroemer, G., L. Galluzzi, *et al.* Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.99-163. 2007.

Kroemer, G. e J. C. Reed. Mitochondrial control of cell death. Nat Med, v.6, n.5, May, p.513-9. 2000.

Lagouge, M. e N. G. Larsson. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. J Intern Med, v.273, n.6, Jun, p.529-43. 2013.

Lamb, N. E., S. L. Sherman, *et al.* Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. Cytogenet Genome Res, v.111, n.3-4, p.250-5. 2005.

Lavin, M. F. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. Oncogene, v.26, n.56, Dec 10, p.7749-58. 2007.

Lavin, M. F. e S. Kozlov. ATM activation and DNA damage response. Cell Cycle, v.6, n.8, Apr 15, p.931-42. 2007.

Lawrence, R. A. e R. F. Burk. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun, v.71, n.4, Aug 23, p.952-8. 1976.

Le May, N., D. Mota-Fernandes, *et al.* NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. Mol Cell, v.38, n.1, Apr 9, p.54-66. 2010.

Lee, J. H. e T. T. Paull. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. Oncogene, v.26, n.56, Dec 10, p.7741-8. 2007.

Lehman, J. J., P. M. Barger, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest, v.106, n.7, Oct, p.847-56. 2000.



- Lemasters, J. J., T. Qian, *et al.* Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. Antioxid Redox Signal, v.4, n.5, Oct, p.769-81. 2002.
- Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, v.1787, n.11, Nov, p.1395-401. 2009.
- Lenaz, G., A. Baracca, *et al.* Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. Biochim Biophys Acta, v.1658, n.1-2, Jul 23, p.89-94. 2004.
- Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem, v.79, p.181-211. 2010.
- Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature, v.362, n.6422, Apr 22, p.709-15. 1993.
- Liu, D., D. L. Croteau, *et al.* Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. J Cereb Blood Flow Metab, v.31, n.2, Feb, p.680-92. 2011.
- Loewenthal Lja, T. H. Xeroderma pigmentosum in African Negroes. Br J Dermatol, v.50, p.66-71. 1938.
- Madamanchi, N. R. e M. S. Runge. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. Circ Res, v.100, n.4, Mar 2, p.460-73. 2007.
- Madrazo, J. A. e D. P. Kelly. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. J Mol Cell Cardiol, v.44, n.6, Jun, p.968-75. 2008.
- Maillard, O., S. Solyom, *et al.* An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. PLoS Biol, v.5, n.4, Apr, p.e79. 2007.
- Mao, G., X. Pan, *et al.* Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. Nucleic Acids Res, v.35, n.8, p.2759-66. 2007.
- Mathieu, N., N. Kaczmarek, *et al.* Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.41, Oct 12, p.17545-50. 2010.
- Mattson, M. P. e G. Kroemer. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. Trends Mol Med, v.9, n.5, May, p.196-205. 2003.
- Mckenzie, M. e M. T. Ryan. Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. IUBMB Life, v.62, n.7, Jul, p.497-502. 2010.

Mcneill, D. R., P. C. Lin, *et al.* XRCC1 haploinsufficiency in mice has little effect on aging, but adversely modifies exposure-dependent susceptibility. Nucleic Acids Res, v.39, n.18, Oct, p.7992-8004. 2011.

Melis, J. P., H. Van Steeg, *et al.* Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. Antioxid Redox Signal, v.18, n.18, Jun 20, p.2409-19. 2013.

Melis, J. P., S. W. Wijnhoven, *et al.* Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. Cancer Res, v.68, n.5, Mar 1, p.1347-53. 2008.

Melov, S., D. Hinerfeld, *et al.* Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. Nucleic Acids Res, v.25, n.5, Mar 1, p.974-82. 1997.

Min, J. H. e N. P. Pavletich. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. Nature, v.449, n.7162, Oct 4, p.570-5. 2007.

Missura, M., T. Buterin, *et al.* Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. EMBO J, v.20, n.13, Jul 2, p.3554-64. 2001.

Mitomap. A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University.

Mocquet, V., J. P. Laine, *et al.* Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step. EMBO J, v.27, n.1, Jan 9, p.155-67. 2008.

Moser, J., H. Kool, *et al.* Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. Mol Cell, v.27, n.2, Jul 20, p.311-23. 2007.

Niedernhofer, L. J., V. A. Bohr, *et al.* Xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients. Mech Ageing Dev, v.132, n.6-7, Jun-Jul, p.340-7. 2011.

Niesse A. Ueber das "Xeroderma Pigmentosum" (Kaposi): Lioderma essentials cum melanosi et telangiectasia. Viertel-jahrschr Dermatol Syphil, p.47-62. 1883.

Niu, R., M. Yoshida, *et al.* Increases in mitochondrial DNA content and 4977-bp deletion upon ATM/Chk2 checkpoint activation in HeLa cells. PLoS One, v.7, n.7, p.e40572. 2012.

Novotny, E. J., Jr., G. Singh, *et al.* Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease. Neurology, v.36, n.8, Aug, p.1053-60. 1986.

O'driscoll, M., A. R. Gennery, *et al.* An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. DNA Repair (Amst), v.3, n.8-9, Aug-Sep, p.1227-35. 2004.

Ogi, T., S. Limsirichaikul, *et al.* Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. Mol Cell, v.37, n.5, Mar 12, p.714-27. 2010.

Ongwijitwat, S., H. L. Liang, *et al.* Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. Gene, v.374, Jun 7, p.39-49. 2006.

Orelli, B., T. B. Mcclendon, *et al.* The XPA-binding domain of ERCC1 is required for nucleotide excision repair but not other DNA repair pathways. J Biol Chem, v.285, n.6, Feb 5, p.3705-12. 2010.

O'rourke, B., S. Cortassa, *et al.* Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. Physiology (Bethesda), v.20, Oct, p.303-15. 2005.

Payne, C. M., C. Weber, *et al.* Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. Carcinogenesis, v.28, n.1, Jan, p.215-22. 2007.

Perocchi, F., V. M. Gohil, *et al.* MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.291-6. 2010.

Perrem, K. e R. R. Reddel. Telomeres and cell division potential. Prog Mol Subcell Biol, v.24, p.173-89. 2000.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.

Polyak, K., Y. Li, *et al.* Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nat Genet, v.20, n.3, Nov, p.291-3. 1998.

Popescu, B. O., A. Cedazo-Minguez, *et al.* Gamma-secretase activity of presenilin 1 regulates acetylcholine muscarinic receptor-mediated signal transduction. J Biol Chem, v.279, n.8, Feb 20, p.6455-64. 2004.

Proietti-De-Santis, L., P. Drane, *et al.* Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. EMBO J, v.25, n.9, May 3, p.1915-23. 2006.

Puigserver, P. e B. M. Spiegelman. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev, v.24, n.1, Feb, p.78-90. 2003.

- Puigserver, P., Z. Wu, *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell, v.92, n.6, Mar 20, p.829-39. 1998.
- Rai, R., J. M. Li, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Rnf8 stabilizes Tpp1 to promote telomere end protection. Nat Struct Mol Biol, v.18, n.12, Dec, p.1400-7. 2011.
- Reed, W. B., G. I. Sugarman, *et al.* DeSanctis-Cacchione syndrome. A case report with autopsy findings. Arch Dermatol, v.113, n.11, Nov, p.1561-3. 1977.
- Rezvani, H. R., A. L. Kim, *et al.* XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. J Clin Invest, v.121, n.1, Jan, p.195-211. 2011.
- Rezvani, H. R., R. Rossignol, *et al.* XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations through NOX-1 activation-mediated reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta, v.1807, n.6, Jun, p.609-19. 2011.
- Ronchi, J. A., A. E. Vercesi, *et al.* Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. J Bioenerg Biomembr, v.43, n.6, Dec, p.709-15. 2011.
- Rotig, A., P. De Lonlay, *et al.* Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. Nat Genet, v.17, n.2, Oct, p.215-7. 1997.
- Russell, L. K., C. M. Mansfield, *et al.* Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. Circ Res, v.94, n.4, Mar 5, p.525-33. 2004.
- Santos, J. M., S. Tewari, *et al.* A compensatory mechanism protects retinal mitochondria from initial insult in diabetic retinopathy. Free Radic Biol Med, v.53, n.9, Nov 1, p.1729-37. 2012.
- Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. Biochim Biophys Acta, v.1813, n.7, Jul, p.1269-78. 2011.
- Scarpulla, R. C., R. B. Vega, *et al.* Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. Trends Endocrinol Metab, v.23, n.9, Sep, p.459-66. 2012.
- Scharer, O. D. Achieving broad substrate specificity in damage recognition by binding accessible nondamaged DNA. Mol Cell, v.28, n.2, Oct 26, p.184-6. 2007.
- Selby, C. P. e A. Sancar. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.21, Oct 14, p.11205-9. 1997.

Sharpless, N. E., D. O. Ferguson, *et al.* Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. Mol Cell, v.8, n.6, Dec, p.1187-96. 2001.

Shimizu, Y., S. Iwai, *et al.* Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. EMBO J, v.22, n.1, Jan 2, p.164-73. 2003.

Shoffner, J. M., M. D. Brown, *et al.* Leber's hereditary optic neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation. Ann Neurol, v.38, n.2, Aug, p.163-9. 1995.

Shoffner, J. M. W., D.C. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, p.1535-1609. 1995.

Simm, A. B., H.J. Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them - can we measure them - should we block them? Signal Transduction, v.3, p.115-125. 2005.

Skulachev, V. P. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun, v.441, n.2, Nov 15, p.275-9. 2013.

Splettstoesser, W. D. e P. Schuff-Werner. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". Microsc Res Tech, v.57, n.6, Jun 15, p.441-55. 2002.

St-Pierre, J., S. Drori, *et al.* Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. Cell, v.127, n.2, Oct 20, p.397-408. 2006.

Stracker, T. H. e J. H. Petrini. The MRE11 complex: starting from the ends. Nat Rev Mol Cell Biol, v.12, n.2, Feb, p.90-103. 2011.

Sugasawa, K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. Mutat Res, v.685, n.1-2, Mar 1, p.29-37. 2010.

Sugasawa, K., J. Akagi, *et al.* Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. Mol Cell, v.36, n.4, Nov 25, p.642-53. 2009.

Sykora, P., D. M. Wilson, 3rd, *et al.* Repair of persistent strand breaks in the mitochondrial genome. Mech Ageing Dev, v.133, n.4, Apr, p.169-75. 2012.

Takata, M., M. S. Sasaki, *et al.* Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. EMBO J, v.17, n.18, Sep 15, p.5497-508. 1998.

Taylor, R. W. e D. M. Turnbull. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet, v.6, n.5, May, p.389-402. 2005.

Tewari, S., J. M. Santos, *et al.* Damaged mitochondrial DNA replication system and the development of diabetic retinopathy. Antioxid Redox Signal, v.17, n.3, Aug 1, p.492-504. 2012.

Trounce, I., E. Byrne, *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. Lancet, v.1, n.8639, Mar 25, p.637-9. 1989.

Tsodikov, O. V., D. Ivanov, *et al.* Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. EMBO J, v.26, n.22, Nov 14, p.4768-76. 2007.

Tsujimoto, Y. e S. Shimizu. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. Apoptosis, v.12, n.5, May, p.835-40. 2007.

Van Den Boom, V., E. Citterio, *et al.* DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. J Cell Biol, v.166, n.1, Jul 5, p.27-36. 2004.

Van Den Heuvel, L., W. Ruitenbeek, *et al.* Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. Am J Hum Genet, v.62, n.2, Feb, p.262-8. 1998.

Van Gool, A. J., E. Citterio, *et al.* The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. EMBO J, v.16, n.19, Oct 1, p.5955-65. 1997.

Vaseva, A. V., N. D. Marchenko, *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell, v.149, n.7, Jun 22, p.1536-48. 2012.

Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep, v.17, n.1, Feb, p.43-52. 1997.

Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science, v.283, n.5407, Mar 5, p.1482-8. 1999.

Wallace, D.C. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.368, n.1622, Jul 19, p.20120267. 2013.

Wallace, D. C., G. Singh, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science, v.242, n.4884, Dec 9, p.1427-30. 1988.

Weissman, L., D. G. Jo, *et al.* Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. Nucleic Acids Res, v.35, n.16, p.5545-55. 2007.

Wilson, D. M., 3rd, D. Kim, *et al.* Variation in base excision repair capacity. Mutat Res, v.711, n.1-2, Jun 3, p.100-12. 2011.

Yakes, F. M. e B. Van Houten. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.2, Jan 21, p.514-9. 1997.

Zhou, M., Z. Diwu, *et al.* A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem, v.253, n.2, Nov 15, p.162-8. 1997.





## *8. Apêndice*



## The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species

R. A. P. Costa · C. D. Romagna · J. L. Pereira ·  
N. C. Souza-Pinto

Published online: 1 February 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Mitochondria contain their own genome, a small circular molecule of around 16.5 kbases. The mitochondrial DNA (mtDNA) encodes for only 13 polypeptides, but its integrity is essential for mitochondrial function, as all 13 proteins are regulatory subunits of the oxidative phosphorylation complexes. Nonetheless, the mtDNA is physically associated with the inner mitochondrial membrane, where the majority of the cellular reactive oxygen species are generated. In fact, the mitochondrial DNA accumulates high levels of oxidized lesions, which have been associated with several pathological and degenerative processes. The cellular responses to nuclear DNA damage have been extensively studied, but so far little is known about the functional outcome and cellular responses to mtDNA damage. In this review we will discuss the mechanisms that lead to damage accumulation and the *in vitro* models we are establishing to dissect the cellular responses to oxidative damage in the mtDNA and to sort out the differential cellular consequences of accumulation of damage in each cellular genome, the nuclear and the mitochondrial genome.

**Keywords** Mitochondrial DNA · Reactive oxygen species · Oxidative DNA damage · Methylene blue · Singlet oxygen

---

Costa and Romagna contributed equally to this work

---

R. A. P. Costa  
Depto. de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas,  
UNICAMP,  
Campinas 13083-887, Brazil

C. D. Romagna · J. L. Pereira · N. C. Souza-Pinto (✉)  
Depto. de Bioquímica, Instituto de Química, USP,  
São Paulo 05508-000, Brazil  
e-mail: nadja@iq.usp.br

### Introduction

In eukaryotic cells, mitochondria play a central role in energy metabolism and control cellular fate after stress through their role in apoptosis and necrosis. A unique feature of these organelles is that they contain their own genome, reminiscent of the bacteria from which they originated. In mammals, the mitochondrial genome is quite small and encodes for only 13 proteins and the ribosomal and transfer RNAs necessary for intramitochondrial translation. But all of these 13 proteins are regulatory components of the mitochondrial respiratory complexes, and mutations in these genes can lead to severe bioenergetic consequences. In fact, over 150 pathogenic mutations have been identified in the mtDNA which cause human diseases (Wallace 2010).

Thus, the stability of the mtDNA is very important for maintenance of cellular function. This is particularly relevant considering that the mtDNA is closely associated with the inner mitochondrial membrane, where reactive oxygen species (ROS) are generated in abundance. These species are extremely reactive with biomolecules and readily oxidize DNA. Moreover, due to the charge difference across the membranes mitochondria can accumulate several lipophilic cationic molecules, some of which can damage DNA as well.

The preferential accumulation of damage in the mitochondrial DNA has been demonstrated in a plethora of pathological and degenerative conditions, including cancer, neurodegenerative diseases and normal aging. These results raised the question whether the differential efficiency in DNA repair activities could be responsible for the accumulation of lesions in mtDNA. In this regard, the existence of DNA repair mechanisms in mammalian mitochondria was initially investigated by Clayton and Friedberg, in 1974,

using UV as a DNA damaging agent (Clayton et al. 1974). They observed that mammalian cells did not remove UV lesions from their mitochondrial genomes, which led to the wide-spread notion that mitochondria lacked DNA repair pathways. While it still holds true that mitochondria from mammalian cells do not have a nucleotide excision repair pathway, the pathway which removes UV-induced lesions, we and others have demonstrated that mitochondria have a proficient base excision repair pathway, and have non-homologous end joining and mismatch repair activities. These topics have been comprehensively reviewed elsewhere (Maynard et al. 2009) and will not be addressed here. Conversely, this review will focus on the relationship between mitochondrial function and mtDNA damage accumulation, and on our efforts to establish models to dissociate the cellular responses induced by damage to the mtDNA from those induced by damage to the nuclear DNA.

### Mitochondrial reactive oxygen species production

The energy required to phosphorylate ADP to ATP during the oxidative phosphorylation process comes from the electrochemical proton gradient generated by the electron transport chain (ETC) (Mitchell 1966). The electrons flowing through the ETC are finally accepted by molecular oxygen, at the active site of cytochrome oxidase, generating H<sub>2</sub>O. However, this process has an important side effect to the cells, which is a constant generation of ROS through mono-electronic reduction of O<sub>2</sub>, upstream of the cytochrome oxidase complex.

It is estimated that between 1–5% of the oxygen consumed during oxidative phosphorylation is partially reduced to generate the radical anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Boveris and Chance 1973; Liu 1997; Turrens 1997), mostly at Complexes I and III of the ETC (reviewed in (Kowaltowski et al. 2009)). However, due to the continuous flow of electrons through the ETC, even this small percentage of electron leak is sufficient to make the mitochondrial O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generation the largest cellular source of ROS in most tissues (Liu 1997; Turrens 1997).

Superoxide anion can be generated primarily by the NADH dehydrogenase (Complex I) (Boveris and Chance 1973; Turrens and Boveris 1980) and by coenzyme Q (Boveris and Chance 1973; Cadenas et al. 1977; Turrens et al. 1985). The production of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in complex I is promoted by NAD-linked substrates, such as malate, glutamate, and pyruvate, and stimulated by rotenone, an inhibitor of electron transfer from complex I to coenzyme Q (Turrens 1997; Turrens and Boveris 1980). The electron leakage at coenzyme Q is probably due to the direct oxidation of the semiquinone anion formed during the

electron transfer cycle by O<sub>2</sub>. Superoxide anion generation at this point is stimulated by succinate, which donates electrons directly into complex II, and by ETC inhibitors, such as cyanide and antimycin A (Boveris et al. 1976; Cadenas et al. 1977; Kowaltowski et al. 1998; Turrens et al. 1985; Turrens 1997).

### Mitochondrial antioxidant system

As the generation of mitochondrial O<sub>2</sub><sup>•-</sup> is an ongoing process, mitochondria have an efficient antioxidant defense system, comprised of enzymatic and non-enzymatic components. Mammalian mitochondria contain Mn-superoxide dismutase (Doonan et al. 1984), which dismutates O<sub>2</sub><sup>•-</sup> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; glutathione peroxidase (Sies and Moss 1978; Zakowski and Tappel 1978), a thiol peroxidase that removes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using glutathione as substrate; and glutathione reductase, which regenerates the reduced glutathione pool at expense of NADPH. Moreover, the energy-dependent NAD(P)<sup>+</sup> transhydrogenase, at the inner mitochondrial membrane, also contributes to the mitochondrial antioxidant defense (Hoek and Rydstrom 1988), as it helps to maintain the NADPH pool in the reduced state by catalyzing the reversible hydride transfer between NADH and NADP<sup>+</sup>, according to the reaction: NADH + NADP<sup>+</sup> ⇌ NAD<sup>+</sup> + NADPH.

Mitochondria also contain lipid-soluble low molecular weight antioxidants, such as α-tocopherol (vitamin E) and UQH<sub>2</sub>, both potent inhibitors of mitochondrial lipid peroxidation (Ernster et al. 1992). Cytochrome c, a component of the ETC, can also act as an antioxidant (Skulachev 1998), as the oxidized form of cytochrome c can oxidize O<sub>2</sub><sup>•-</sup> back to O<sub>2</sub>. It is noteworthy that the cytochrome oxidase complex, another component of the ETC, promotes the catabolism of NO<sup>•</sup> to NO<sub>2</sub><sup>•-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. This process not only removes NO<sup>•</sup>, but also prevents the formation of the potent oxidant peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Giulivi 1998).

### Oxidative stress and mitochondrial permeability transition (MPT)

When the mitochondrial generation of ROS exceeds its antioxidant capacity, mitochondrial proteins, lipids and nucleic acids become targets of oxidation by these species. Under these conditions, mitochondrial membrane proteins suffer extensive oxidation (Castilho et al. 1995; Castilho et al. 1996; Fagian et al. 1990; Kowaltowski et al. 1996a, b; Valle et al. 1993). Reactive oxygen species, especially hydroxyl radical, can oxidize cysteine and methionine residues of proteins, leading to the formation

of dithiol crosslinks and methionine sulfoxide crosslinks, respectively.

The oxidation of inner mitochondrial membrane proteins leads to a nonspecific mitochondrial permeabilization, known as mitochondrial permeability transition (MPT) (Vercesi et al. 1997; Zoratti and Szabo 1995). This phenomenon is characterized by a progressive permeabilization of the inner mitochondrial membrane, which gradually becomes permeable to protons, ions, osmotic support and even small proteins. The MPT is dependent on the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intramitochondrial compartment, and is inhibited by submicromolar concentrations of the immunosuppressant cyclosporin A (Broekemeier et al. 1989; Crompton et al. 1988), probably due to its binding to inner mitochondrial membrane cyclophilins, which are required for MPT opening (Connern and Halestrap 1994; Nicolli et al. 1996). This process is referred to as a “permeability transition” because it can be partially reversed by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  chelators or dithiol reducing agents, immediately after induction of permeabilization (Castilho et al. 1996; Hunter and Haworth 1979; Valle et al. 1993). The molecular mechanisms leading to MPT in conditions of oxidative stress are extensively discussed elsewhere in this issue (Alberici et al. 2011).

A consequence of MPT can be an increase in the mitochondrial generation of ROS, likely associated with increased intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and impaired respiration, as demonstrated in intact cells (Zorov et al. 2000) and isolated mitochondria (Batandier et al. 2004; Maciel et al. 2001). Thus, MPT can contribute to the accumulation of oxidative damage in mitochondria, including DNA lesions.

#### Mitochondrial DNA damage accumulation

Reactive oxygen species, like the hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), can abstract protons or attack molecules at electron-dense sites, generating secondary radical species which undergo intramolecular rearrangements resulting in more stable products. In nucleic acids, both the bases as well as the sugar are subjected to radical attack, leading to base modifications and abasic sites and strand breaks, respectively (Cooke et al. 2003). The  $\cdot\text{OH}$  can add to the double bonds of the bases with a reaction rate limited by diffusion, of around  $4.5 \times 10^9$  to  $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Evans et al. 2004). These attacks result mostly in hydroxylation at C5 and C6 of pyrimidines and C4, C5 and C8 of purines. To date, over 80 different oxidized bases have been identified and characterized in DNA exposed to various oxidants, including  $\text{H}_2\text{O}_2$  and singlet oxygen (Evans et al. 2004).

The mtDNA is associated with the inner mitochondrial membrane, as part of a large nucleoprotein complex known as nucleoid. This supramolecular arrangement has been

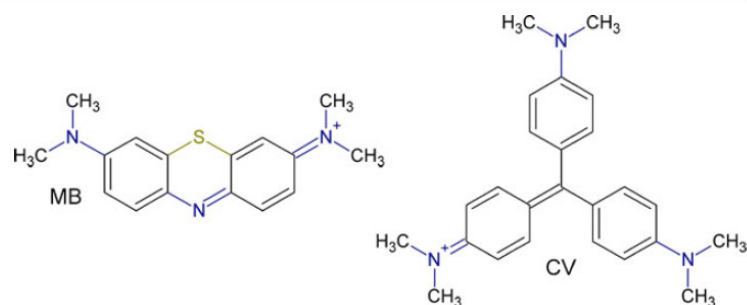
recently identified, and the protein components and the dynamics of nucleoids in mammalian mitochondria are still under intense investigation (reviewed in Spelbrink 2010). Nonetheless, while this organization may provide some protection against DNA damage, the fact that the mtDNA is in close proximity with the ETC, where most ROS are generated, implies that the mtDNA is an important target for oxidative damage. In fact, mtDNA accumulates more 8-hydroxyguanosine, the most abundant oxidized base in DNA, than the nuclear DNA in several conditions, including aging and neurodegenerative diseases (for review, see Gredilla et al. 2010).

#### In vitro models to study the effects of mtDNA oxidative damage accumulation

DNA lesions, such as those introduced by ROS, can be either mutagenic or cytotoxic, depending on whether they block DNA and/or RNA polymerases or not. The biological consequences of oxidative DNA damage have been extensively studied, and range from induction of apoptotic and necrotic cell death to cellular transformation (Maynard et al. 2009). However, most of the experimental models used in these studies are such that DNA lesions are induced both in the nucleus as well as in the mitochondrial DNA, and thus it is difficult to sort out whether the responses are specific to lesions in either genome. Cellular responses to nuclear DNA damage have been extensively characterized in the last decade, and include the activation of a signaling cascade that leads to cell cycle arrest and induction of DNA repair pathways (Huen and Chen 2010). On the other hand, little is known about how mammalian cells respond to mtDNA damage, but since mtDNA repair enzymes are all encoded by nuclear genes and imported into mitochondria after being transcribed in the cytoplasm, it is likely that mammalian cells have specific signaling pathways that control these processes. Yeast cells respond to changes in mtDNA content and mitochondrial function via a pathway known as the retrograde response (Butow and Avadhani 2004), in which nuclear and mitochondrial gene expression are modulated concomitantly to adjust the cellular demand for energy, but no mammalian counterpart of such a signaling pathway has been described yet.

A cellular model in which lesions are introduced exclusively in the mitochondrial genome is required in order to sort out the pathways activated only in response to mtDNA damage. Because mitochondria are known to accumulate positively charged molecules (Murphy 1997; Ross et al. 2005), we have chosen to use photosensitizers which are charged under physiological pH. Methylene blue (MB) and crystal violet (CV) are both positively charged at pH 7.0 (Fig. 1) and have been reported to localize in

**Fig. 1** Chemical structure of methylene blue (MB) and crystal violet (CV), showing the net positive charge at pH 7

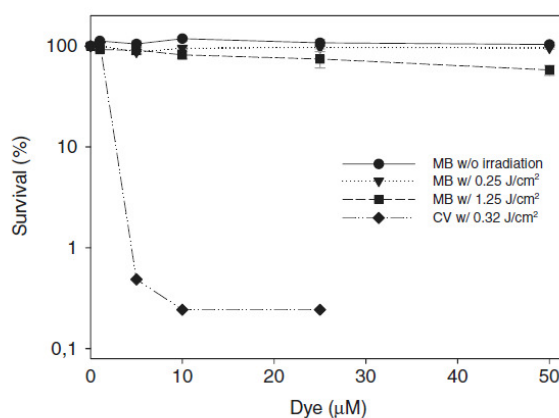


mitochondria (Atamna et al. 2008; Huang et al. 2005; Indig et al. 2000) as well as in other subcellular compartments (Atamna et al. 2008; Blazquez-Castro et al. 2009; Mellish et al. 2002). These molecules constitute an interesting model system, as they generate singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) upon photo-excitation with a well established photochemistry (Moore et al. 1972; Zhu and Finlay 2008). Singlet oxygen can attack the DNA bases forming several oxidized products, of which 8-hydroxy-guanosine is a major one (Devasagayam et al. 1991; Di Mascio et al. 1990).

Thus, we have employed these two compounds to introduce oxidative lesions in the mtDNA and evaluated cell survival after incubation and photoactivation of the dyes. For this, HeLa cells were plated at 500 cells per dish and incubated with increasing concentrations (from 1 to 50  $\mu\text{M}$ ) of MB and CV in the dark for 30 min. After this, the cultures were extensively washed in phosphate-buffered saline (PBS) and irradiated in PBS with the appropriate LEDs for each dye (red for MB and yellow for CV) for 0, 2 or 10 min. The buffer was then replaced by culture medium and the cells incubated for 7–10 days, for colony formation assessment, as described in (de Souza-Pinto et al. 1996). Figure 2 shows the results obtained. Surprisingly, MB showed no cytotoxic effect with any concentration used, even with the highest dose of light, 1.25  $\text{J}/\text{cm}^2$ . On the other hand, CV showed a significant, dose-dependent cytotoxic effect in the same concentration range (1–25  $\mu\text{M}$ ), even with a lower light dose (0.32  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) than used for MB. This result suggests that even though these compounds have similar photochemical properties in solution, they may behave differently in cells, as the biological effect is quite diverse. We speculate that the different effects were due to the formation of dimers by MB intracellular. It has been previously shown that MB can dimerize after a certain concentration threshold and that these dimers do not generate  $^1\text{O}_2$  upon photo-excitation (Gabrielli et al. 2004; Severino et al. 2003). On the other hand, CV photochemistry is not altered by the formation of dye aggregates (Jones et al. 1991). Thus, if the active accumulation of MB inside the mitochondria reached levels high enough to induce dimer formation, the absence of a cytotoxic effect could be due to the fact that under these conditions no

oxidative damage had been formed. In these experiments, the dye/cell ratio was  $6 \times 10^{12}$  molecules of dye/cell, at the 1  $\mu\text{M}$  concentration. We are now testing this hypothesis by exposing the cells to a much lower dye/cell ratio, and our preliminary results support the hypothesis that dimer formation contributed to lack of cytotoxicity in cells incubated with MB (not shown).

It is important to point out here that a very careful and thorough characterization of these cellular models are needed to support any conclusion as to the specificity of the cellular responses to mtDNA oxidative damage. For that purpose, we are also quantifying the induction of oxidized DNA lesions in the nuclear and mitochondrial DNA of cells exposed to MB and CV, as well as to another photosensitizer, RO19-8022



**Fig. 2** Clonogenic survival of HeLa cells treated with MB or CV. Five hundred cells were plated in 10 cm dishes and allowed to fix. The medium was then replaced by PBS containing increasing concentrations of MB or CV, as shown in the figure, and the cultures incubated for 30 min, at 37 °C. The treatments were removed, the cultures washed twice with PBS and irradiated with the doses in the figure with light-emitting diodes at 700 nm (for MB) or 560 nm (for CV). The PBS was then replaced with culture medium and the plates incubated for 7–10 days for colony formation. Survival was calculated relative to the plating efficiency of control cultures (treated with PBS alone). The results shown are average  $\pm$  error of two independent experiments, performed in triplicate, except for CV in which one typical experiment is presented

(Will et al. 1999) which does not seem to have a specific subcellular localization, and induces oxidative damage in the nuclear DNA (Thorslund et al. 2002; Will et al. 1999). These models will allow for a precise characterization of the cellular responses induced after oxidative damage in mitochondria, and to the identification of the relative contribution of mtDNA damage and damage to other macromolecules in the molecular events that lead to oxidative stress-induced mitochondrial and cellular dysfunction.

**Acknowledgements** This work is supported by grants from FAPESP and CNPq/FAPESP through the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) “Processos redox em biomedicina/Redoxoma”.

## References

- Alberici LC, Vercesi AE, Oliveira HCF (2011) *J Bioenerg Biomembr*. doi:10.1007/s10863-011-9326-y
- Atamna H, Nguyen A, Schultz C, Boyle K, Newberry J, Kato H, Ames BN (2008) *FASEB J* 22:703–712
- Batandier C, Leverve X, Fontaine E (2004) *J Biol Chem* 279:17197–17204
- Blazquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodriguez F, Zamarron A, Juarranz A (2009) *Photochem Photobiol Sci* 8:371–376
- Boveris A, Chance B (1973) *Biochem J* 134:707–716
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) *Biochem J* 156:435–444
- Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR (1989) *J Biol Chem* 264:7826–7830
- Butow RA, Avadhani NG (2004) *Mol Cell* 14:1–15
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) *Arch Biochem Biophys* 180:248–257
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995) *Free Radic Biol Med* 18:479–486
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1996) *J Bioenerg Biomembr* 28:523–529
- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC (1974) *Proc Natl Acad Sci USA* 71(7):2777–2781
- Connem CP, Halestrap AP (1994) *Biochem J* 302(Pt 2):321–324
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) *FASEB J* 17:1195–1214
- Crompton M, Ellinger H, Costi A (1988) *Biochem J* 255:357–360
- de Souza-Pinto NC, Vercesi AE, Hoffmann ME (1996) *Free Radic Biol Med* 20:657–666
- Devasagayam TP, Steenken S, Obendorf MS, Schulz WA, Sies H (1991) *Biochemistry* 30:6283–6289
- Di Mascio P, Menck CF, Nigro RG, Sarasin A, Sies H (1990) *Photochem Photobiol* 51:293–298
- Doonan S, Barra D, Bossa F (1984) *Int J Biochem* 16:1193–1199
- Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K (1992) *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No* 548–551
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS (2004) *Mutat Res* 567:1–61
- Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE (1990) *J Biol Chem* 265:19955–19960
- Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS (2004) *Photochem Photobiol* 79:227–232
- Giulivi C (1998) *Biochem J* 332(Pt 3):673–679
- Gredilla R, Bohr VA, Stevnsner T (2010) *Exp Gerontol* 45:478–488
- Hoek JB, Rydstrom J (1988) *Biochem J* 254:1–10
- Huang Y, Zhang F, Gong Y (2005) *Tetrahedron Lett* 46:7217–7219
- Huen MS, Chen J (2010) *Trends Biochem Sci* 35(2):101–108
- Hunter DR, Haworth RA (1979) *Arch Biochem Biophys* 195:453–459
- Indig GL, Anderson GS, Nichols MG, Bartlett JA, Mellon WS, Sieber F (2000) *J Pharm Sci* 89:88–99
- Jones G, Oh C, Goswami K (1991) *J Photochem Photobiol, A* 57:65–80
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE (1996a) *J Biol Chem* 271:2929–2934
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1996b) *FEBS Lett* 378:150–152
- Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE (1998) *J Biol Chem* 273:12766–12769
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) *Free Radic Biol Med* 47:333–343
- Liu SS (1997) *Biosci Rep* 17:259–272
- Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF (2001) *J Neurochem* 79:1237–1245
- Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA (2009) *Carcinogenesis* 30(1):2–10
- Mellish KJ, Cox RD, Vernon DJ, Griffiths J, Brown SB (2002) *Photochem Photobiol* 75:392–397
- Mitchell P (1966) *Biol Rev Camb Philos Soc* 41:445–502
- Moore C, Wallis C, Melnick JL, Kuns MD (1972) *Infect Immun* 5:169–171
- Murphy MP (1997) *Trends Biotechnol* 15:326–330
- Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P (1996) *J Biol Chem* 271:2185–2192
- Ross MF, Kelso GF, Blaikie FH, James AM, Cocheme HM, Filipovska A, Da RT, Hurd TR, Smith RA (2005) *Murphy MP. Biochem Mosc* 70:222–230
- Severino D, Junqueira HC, Gugliotti M, Gabrielli DS, Baptista MS (2003) *Photochem Photobiol* 77:459–468
- Sies H, Moss KM (1978) *Eur J Biochem* 84:377–383
- Skulachev VP (1998) *FEBS Lett* 423:275–280
- Spelbrink JN (2010) *IUBMB Life* 62:19–32
- Thorslund T, Sunesen M, Bohr VA (2002) *Stevnsner T. DNA Repair Amst* 1:261–273
- Turrens JF (1997) *Biosci Rep* 17:3–8
- Turrens JF, Boveris A (1980) *Biochem J* 191:421–427
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) *Arch Biochem Biophys* 237:408–414
- Valle VG, Fagian MM, Parentoni LS, Meinicke AR, Vercesi AE (1993) *Arch Biochem Biophys* 307:1–7
- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF (1997) *Biosci Rep* 17:43–52
- Wallace DC (2010) *Environ Mol Mutagen* 51(5):440–450
- Will O, Gocke E, Eckert I, Schulz I, Pflaum M, Mahler HC, Epe B (1999) *Mutat Res* 435:89–101
- Zakowski JJ, Tappel AL (1978) *Biochim Biophys Acta* 526:65–76
- Zhu TC, Finlay JC (2008) *Med Phys* 35:3127–3136
- Zoratti M, Szabo I (1995) *Biochim Biophys Acta* 1241:139–176
- Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ (2000) *J Exp Med* 192:1001–1014





## *9. Anexos*



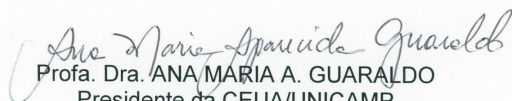
## 9.1. Parecer de Aprovação do Comitê de Ética



### DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos que o projeto de pesquisa intitulado Avaliação das funções mitocondriais de células deficientes na proteína XPC, envolvida na via de reparo de excisão de nucleotídeos, de responsabilidade da Doutoranda Rute Alves Pereira e Costa, sob orientação da Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza-Pinto não se enquadra na exigência da lei vigente Lei No. 11.794 (08-10-2008) - LEI AROUCA, tendo em vista que o mesmo utiliza experimentação de células humanas e não animais, não havendo necessidade de submissão de protocolo de pesquisa junto a Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP.

Campinas, 21 de janeiro de 2013.

  
Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

