Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Nathalia de Oliveira Meireles da Costa

Efeito da p53 sobre a expressão e atividade da enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase

Rio de Janeiro
2011

Nathalia de Oliveira Meireles da Costa

Efeito da p53 sobre a expressão e atividade da enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biociências Nucleares.

Orientador : Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Coorientador: Dr. Pierre Hainaut

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C837 Costa, Nathalia de Oliveira Meireles da.
Efeito da p53 sobre a expressão e atividade da enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase / Nathalia de Oliveira Meireles da Costa – 2011.
113 f. : il.

Orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto.
. Coorientador: Pierre Hainaut.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia.

1. Câncer – Aspectos genéticos – Teses. 2. Esôfago – Câncer – Teses. 3. Reparo de DNA – Teses. 4. Timina-DNA Glicosilase. 5. Genética humana. 6. Fenótipo. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro. II. Hainaut, Pierre. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-006.6:575

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Nathalia de Oliveira Meireles da Costa

Efeito da p53 sobre a expressão e atividade da enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biociências Nucleares.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2011.

Coorientador:

Dr. Pierre Hainaut
International Agency for Research on Cancer

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. João Viola
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

_____
Prof.ª Dra. Edenir Inez Palmero
Hospital de Câncer de Barretos

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

À minha família e ao Alexandre, meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pela orientação, confiança, auxílio e amizade ao longo dos últimos nove anos. Sua determinação e dedicação são inspiradoras. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Pierre Hainaut por ter permitido que eu trabalhasse em seu laboratório e por ter me recebido tão bem. Agradeço toda a disponibilidade, ajuda, sugestões e discussões científicas durante a realização do trabalho. Trabalhar com você foi um prazer e uma honra!

Ao Dr. Peter Swann por toda inestimável ajuda e disponibilidade oferecidas desde o início desse projeto. Pelas ótimas sugestões, discussões e pelo carinho!

Ao Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano, por toda a ajuda e agradável companhia no laboratório ao longo de todos esses anos e pela revisão dessa tese.

Aos Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano, Profa. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel, Dr. João Viola, Dra Edenir Inez Palmero, Profa. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo e Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira pela participação na banca.

À Profa. Dra. Ana Maria Rossini Teixeira pelo apoio e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos meus queridíssimos amigos do laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular da UERJ: Tatiana, Sheila, Davy, Suellen, Isabela, Alda, Leão, Flávia, Denise, Leo e todos os “novos” integrantes do laboratório, por estarem sempre dispostos a ajudar e por proporcionarem um ambiente bastante agradável de trabalho. Vocês são demais!

Às minhas ex-colegas de laboratório e grandes amigas “para sempre” Silvia e Islaine, pela amizade e companheirismo constantes!

À Tati, um agradecimento especial por toda a ajuda e a paciência!!! Você é uma grande amiga!

À Sheila pelas discussões científicas (ou não) e ótimos momentos passados juntos em Lyon!

Ao Davy, pela amizade e pelos momentos de descontração!

Aos meus grandes amigos: Flávia, Jana, Dominique, Fabio, Brandão, Rafael e Raphael, por estarem sempre por perto e me apoiando. Adoro vocês!!!

A todos da Seção de Mecanismos de Carcinogênese do IARC por terem tornado os anos que passei na França extremamente agradáveis. Agradeço especialmente à Agnès Hautefeuille e à Ghyslaine Martel-Planche pelo maravilhoso apoio técnico e ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

A todos que conheci em Lyon e que se tornaram ótimos amigos: Annette, Frida, Sandra, Edenir, Matias, Stephanie, Pedro, Arnaud, Yayun, Suna, Chiara, Amina, Hind, Nagla, Amelie, Phil, Ludmila, Karen, Ivan, Lívia, Liliane, David, Anastas, Marion, Cyril, Thomas e Carla. Muito obrigada por tudo!

A todos do Departamento de Bioquímica, por serem sempre atenciosos e solícitos, ajudando em tudo o que é possível.

À Myriam Loureiro Almeida, por todo o carinho!

À minha irmã Anna e meu sobrinho Antônio, pelo carinho, apoio, companhia, momentos de pura diversão e por fazerem parte da minha vida!

Aos meus pais, Nilson e Marília, por tudo o que representam para mim. Sem o apoio de vocês nada seria possível: vocês são muito importantes para mim!!!!

Ao Alexandre, meu grande companheiro, meu agradecimento mais do que especial! Agradeço pelo amor, carinho, respeito, cumplicidade ao longo de todos esses anos. Por acreditar em mim e sempre me incentivar, além de tentar me fazer enxergar as coisas com mais clareza. Por sempre me ajudar e estar disponível quando preciso. E, pela infinita paciência comigo. Você me faz acreditar que tudo é possível!

A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade

Julio Verne

RESUMO

COSTA, Nathalia de Oliveira Meireles da*. Efeito da p53 sobre a expressão e atividade da enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase. 2011*. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

O câncer de esôfago é uma malignidade altamente freqüente e letal. Uma característica específica das áreas de alta incidência de câncer de esôfago é a grande proporção de duplas mutações no gene *TP53*, sendo, ao menos uma delas, uma transição G para A em sítios CpG. Essas transições resultam de malpareamentos G•T causados pela desaminação espontânea da 5-metilcitosina em ilhotas CpG. A enzima de reparo de DNA Timina-DNA Glicosilase (TDG) é responsável pelo primeiro passo na remoção da timina de malpareamentos G•T em CpG. A alta proporção de mutações em sítios CpG em câncer de esôfago das áreas de alta incidência sugere que a via de reparo de DNA iniciada pela TDG pode estar prejudicada. A presença de duplas mutações, sendo ao menos uma delas em CpG, levantou a hipótese de que a primeira mutação no *TP53* reduz a atividade da via de reparo iniciada pela TDG, que acarretaria a segunda mutação em sítios CpG. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da p53 sobre a expressão e atividade da TDG. Os resultados obtidos mostram que a expressão de *TDG* é regulada transcricionalmente pela p53 numa gama de linhagens celulares e é induzida pelo dano ao DNA, de forma p53-dependente. Além disto, os resultados apontam um possível papel da proteína p53 ativa na migração nuclear e atividade da TDG. Estes resultados ainda nos levam à conclusão de que o silenciamento de *TDG* aumenta a sensibilidade à morte celular induzida por MMS quando a p53 é encontrada na forma selvagem, mas não quando esta proteína é mutada, e de que o status mutacional de *TP53* parece afetar a expressão de *TDG* em CEE primários. Juntos esses resultados sugerem que a p53 regula o reparo de DNA mediado pela TDG e que a inativação de p53 em células tumorais pode contribuir para a aquisição de um *mutator phenotype*.

Palavras-chave: Reparo de DNA. TDG. *Mutator phenotype.* Estabilidade genética
.

ABSTRACT

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is a highly frequent and fatal malignancy in the world. A peculiar characteristic of the high incidence areas of esophageal cancer is the large proportion of double mutations in *TP53* gene, being, at least one of them, a G to A transition at CpG sites. These transitions result from G•T mismatches caused by the spontaneous deamination of 5-methylcytosine at CpG sites. The DNA repair enzyme Thymine-DNA Glycosylase (TDG) is responsible for the first step in the removal of the thymidine from the G•T mismatches at CpG sites. The high proportion of mutations at CpG sites in esophageal tumors in the high incidence areas suggests that the DNA repair pathway initiated by TDG might be impaired. The large number of double mutations, with one being at a CpG site, raised the possibility that the first mutation in *TP53* reduces the activity of the TDG base excision repair pathway, increasing the chance of a second mutation event at a CpG site. In this way, the aim of this work was to analyze the effect of p53 on the expression and activity of TDG. The results achieved show that *TDG* expression is regulated by p53 in a variety of cells lines at the trancriptional level and induced by DNA–damage in a p53-dependent manner. Furthermore, these results point out a possible role of active p53 in the nuclear migration and activity of TDG. The results further support the notion that *TDG* silencing increases the sensitivity to cell death induced by Methylmethane sulphonate when p53 is found in a wild-type, but not in a mutant form, and that *TP53* mutation seems to affect *TDG* expression in primary ESCC. Together, these results suggest that p53 regulates TDG-mediated repair and that p53 inactivation in cancer cells may contribute to a mutator phenotype through loss of TDG function.

Keywords: DNA repair. TDG. Mutator phenotype. Ggenetic stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação espacial da incidência de tumores de esôfago por regiões ao redor do mundo..... 17

Figura 2- Representação espacial das taxas brutas de incidência de tumores de esôfago para o ano de 2010 no Brasil..... 18

Figura 3: Esquema ilustrativo dos três diferentes domínios funcionais da p53..... 20

Figura 4: Visão sintética da via p53 e suas três classes de sinais ativadores..... 21

Quadro 1 Síndromes humanas provenientes de deficiências em vias de reparo de DNA..... 25

Figura 5: Figura esquemática da via de Reparo de DNA por Excisão de Base (BER)..... 28

Figura 6: Figura esquemática do alinhamento das proteínas MUG..... 28

Figura 7: Via BER para reparo de malpareamentos G:T em sítios CpG iniciada pela TDG..... 29

Figura 8: Esquema representativo do processo de SUMOilação da TDG..... 31

Figura 9: Funções potenciais para a p53 nas vias de Reparo de DNA por Excisão (BER e NER)..... 33

Figura 10: Figura esquemática da constituição do vetor pcDNA3..... 40

Quadro 2: Seqüências específicas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados na análise da expressão do RNAm da *TDG*, *TP53* e *GAPDH*..... 44

Figura 11: Figura esquemática da constituição dos vetores pDrive e PGL3 basic..... 50

Figura 12: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 58

Figura 13: Western blotting da proteína TDG purificada e do extrato de células TE-1 utilizando anticorpo anti-TDG e anti-SUMO..... 59

Figura 14: Expressão protéica da TDG nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 59

Figura 15: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 60

Figura 16: Expressão protéica da p53 nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37°C..... 61

Figura 17: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-1 após transfecção com siRNA p53 ou siRNA TDG..... 61

Figura 18: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na amostra transfectada com vetor de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 63

Figura 19: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG nas amostra transfectadas com vetor de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 63

Figura 20: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-13 após transfecção do vetor de expressão de p53..... 64

Figura 21: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras transfectadas com vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 65

Figura 22: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica do p53 nas amostras transfectadas com vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 65

Figura 23: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC..... 67

Figura 24: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC..... 67

Figura 25: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC..... 68

Figura 26: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC..... 69

Figura 27: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG nas amostras controle e tratadas com MMS na linhagem celular TE-1 mantida à 32ºC ou 37ºC..... 69

Figura 28: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-1 mantidas à 32ºC ou 37ºC após o tratamento com MMS..... 70

Figura 29: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* nas

amostras não tratadas (CTL) e tratadas com doxorubicina nas linhagens celulares MN1 e MDD2..... 72

Figura 30: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras não tratadas (CTL) e tratadas com doxorubicina nas linhagens celulares MN1 e MDD2..... 72

Figura 31: Imagens representativas da análise por Microscopia Confocal da expressão e localização subcelular da TDG e p53 nas amostras controle e nas amostras tratadas com doxorubicina das linhagens celulares MN1 e MDD2..... 73

Figura 32: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células NHBE..... 75

Figura 33: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células NHBE..... 76

Figura 34: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG nas amostras controle e tratadas com MMS na linhagem celular NHBE..... 76

Figura 35: Esquema representativo da região promotora do gene *TDG* e seus elementos responsivos à p53..... 77

Figura 36: Amplificação do promotor do gene *TDG* após transfecção de vetor de expressão de p53 em células TE-13 e realização do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP)..... 78

Figura 37: Amplificação do promotor do gene *p21/WAF1* após transfecção de vetor de expressão de p53 em células TE-13 e realização do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP)..... 78

Figura 38: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-13 transfectadas com vetor de expressão de p53..... 80

Figura 39: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-1 (32ºC e 37ºC) tratadas com MMS..... 81

Figura 40: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-13 transfectadas de vetor de expressão de p53 após deleção dos elemntos responsivos à p53..... 82

Figura 41: Taxa de proliferação das células TE-1 mantidas à 32ºC e 37ºC após tratamento com MMS 83

Figura 42: Contagem de células TE-1 (32ºC e 37ºC) na fase subG1 do ciclo celular após silenciamento de *TDG* e tratamento com MMS..... 84

Figura 43: Contagem de células TE-1 (32ºC e 37ºC) nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) após silenciamento de *TDG* e tratamento com

MMS 85

Figura 44: Taxa de incorporação de BrdU pelas células TE-1 (32ºC e 37ºC) após silenciamento de *TDG* e tratamento com MMS..... 85

Figura 45: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de TDG nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53*..... 87

Figura 46: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras 88

Figura 47: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras..... 89

Figura 48: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou mutação em *TP53*..... 90

Figura 49: Valores de expressão do RNAm da *TDG* na mucosa adjacente às amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*..... 91

Figura 50: Variação de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53,* em relação às suas mucosas adjacentes..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 58

Tabela 2: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 60

Tabela 3: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na amostra transfectada com vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 63

Tabela 4: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na amostra transfectada com vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13..... 65

Tabela 5: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC..... 67

Tabela 6: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC..... 67

Tabela 7: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC..... 68

Tabela 8: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC..... 69

Tabela 9: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras não tratadas (CTL) e tratadas com doxorubicina nas linhagens celulares MN1 e MDD2..... 72

Tabela 10: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C..... 72

Tabela 11: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células NHBE..... 75

Tabela 12: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle e nas amostras tratadas com MMS de células NHBE..... 76

Tabela 13: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53*..... 87

Tabela 14: Valores de mediana, erro e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53* e na mucosa normal adjacente às amostras..... 88

Tabela 15: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não apresentam mutação em *TP53* e na mucosa normal adjacente às amostras..... 89

Tabela 16: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*..... 90

Tabela 17: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na mucosa normal adjacente às amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*..... 91

Tabela 18: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53,* em relação às suas mucosas adjacentes..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - adenocarcinoma de esôfago
APS - persulfato de amônia
BER - reparo de DNA por excisão de bases
BSA - albumina bovina sérica
cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar
CEE - carcinoma epidermóide de esôfago
COX-2 - ciclooxigenase 2
CREB - proteínas ligadoras à elementos de resposta de AMP cíclico
DNA - ácido desoxirribonucléico
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindole
DTT - ditiotreitol
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
MBD4 - proteína com domínio de ligação à metil-CpG 4
MMR - reparo de DNA de emparelhamento errôneo
MMS - metil metanosulfonado
MUG - uracil-DNA glicosilases *mismatches* - específicas
NER - reparo de DNA por excisão de nucleotídeos
PBS- tampão fosfato-salina
PCR - reação em cadeia da polimerase
PMSF- fenilmetilsulfonil fluoridro
pH - potencial hidrogeniônico
RNA - ácido ribonucléico
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
rpm - rotações por minuto
RT - transcrição reversa
SDS - duodecil sulfato de sódio
siRNA - pequeno RNA de interferência
SUMO - pequenas proteínas modificadoras ubiquitina-*like*
TDG - timina-DNA glicosilase
TEMED - 2,3,7,8 – tetraclorodibenzeno-p-dioxina
TRIS- trihidroximetil aminometano
UDG - uracil-DNA glicosilases

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	**OBJETIVO**	35
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	36
2.1	**Amostras de carcinoma epidermóide de esôfago**	36
2.2	**Linhagens celulares**	36
2.2.1	TE-1	36
2.2.2	TE13	38
2.2.3	MN1 e MDD2	38
2.2.4	NHBE	38
2.3	**Tratamentos**	38
2.3.1	Inibição da Expressão Gênica do *TP53* pelo uso do RNA de interferência (siRNA)	39
2.3.2	Transfecção do vetor de expressão de p53	39
2.3.3	Tratamento com a droga indutora de dano ao DNA doxorubicina	41
2.3.4	Tratamento com o agente mutagênico Metil metanosulfonado (MMS)	41
2.4	**Coleta das células**	42
2.5	**Extração e quantificação de RNA**	42
2.6	**Reação da Transcrição Reversa (RT)**	43
2.7	**RT PCR em tempo real**	43
2.8	**Extração e quantificação de proteínas totais**	45
2.9	***Western blotting***	46
2.10	**Microscopia confocal**	47
2.11	**Clonagem do promotor de *TDG***	49
2.12	**Mutagênese sítio-dirigida**	51
2.13	**Ensaio Duplo da Luciferase**	52

2.14 **Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)**..... 53

2.15 **Ensaio de proliferação WST-1**..... 54

2.16 **Citometria de fluxo**..... 54

2.17 **Análises estatísticas**..... 56

3 **RESULTADOS**..... 57

3.1 **Regulação da expressão de *TDG* pela p53 selvagem ou mutada**..... 57

3.1.1 Efeito do RNA de interferência para p53 (p53 siRNA) sobre a expressão do RNAm da e proteína de *TDG* na linhagem celular TE-1..... 57

3.1.2 Efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão do RNAm e da proteína *TDG* na linhagem celular TE-13..... 62

3.1.3 Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm e da proteína *TDG* na linhagem celular TE-1 64

3.1.4 Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm e da proteína *TDG* nas linhagens celulares MN1 e MDD2..... 71

3.1.5 Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm e da proteína *TDG* nas linhagem celular NBHE..... 74

3.2 **Regulação do promotor do gene TDG pela p53**..... 77

3.2.1 Elementos responsivos à p53 presentes no promotor do gene *TDG*..... 77

3.2.2 Ligação da p53 no promotor do gene *TDG*..... 77

3.2.3 Ativação do promotor do gene *TDG* pela p53..... 79

3.3. **Efeito do silenciamento do gene *TDG* e do dano ao DNA causado pelo MMS na proliferação de células TE-1.**..... 83

3.4. **Efeito de mutações em *TP53* sobre a expressão do RNAm da *TDG* em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago**..... 84

4 **DISCUSSÃO**..... 93

5 **CONCLUSÕES**..... 101

REFERÊNCIAS...... 102

INTRODUÇÃO

Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago é uma malignidade tanto comum quanto letal, respondendo pela nona posição em incidência e oitava em mortalidade dentre todos os tipos de câncer no mundo, e representando o oitavo mais incidente e o sétimo mais letal dentre os diferentes tipos de tumores no Brasil (GLOBOCAN, 2008) (Figura 1). Esse tipo de tumor ocorre principalmente em países em desenvolvimento, com sobrevida de cinco anos estimada em menos de 20% dos casos (COHEN, D.J. e AJANI, J. 2011). No Brasil, a estimativa para o ano de 2010 foi a do surgimento de até 18,5 novos casos para cada 100.000 homens e 7,18 novos casos para cada 100.000 mulheres (MS/INCA website, 2009) (Figura 2).

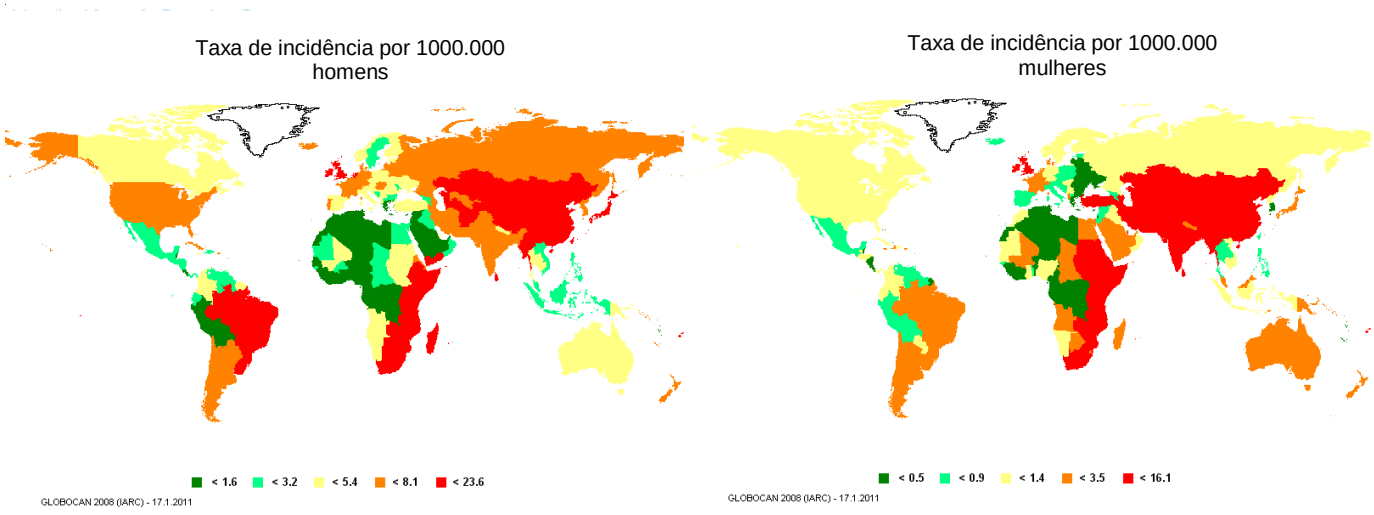


Figura 1: Representação espacial da incidência de tumores de esôfago dividida por regiões ao redor do mundo, segundo dados do GLOBOCAN 2008 (IARC/OMS).

Existem 2 tipos histopatólogicos principais e que respondem por aproximadamente 95% dos casos de câncer de esôfago: o carcinoma epidermóide (CEE) e o adenocarcinoma (ADE). Estes dois tipos diferem completamente quanto aos fatores etiológicos associados, às populações afetadas, à localização geográfica, às alterações moleculares e à evolução da neoplasia (HONGO, M. *et al*., 2009).

Embora nas últimas décadas venha sendo observado um aumento na incidência do ADE nos países desenvolvidos, com destaque para os Estados Unidos (HEATH, E.L. *et al*; POHL, H. e WELCH, H.G., 2005), o CEE representa o tipo mais freqüente respondendo por aproximadamente 90% dos casos (KUWANO, H. *et al.*, 2005). Uma característica peculiar do CEE é a acentuada variação geográfica de sua incidência, com áreas de alta incidência margeando áreas em que a incidência desta doença é até dez vezes menor (Figura 1).

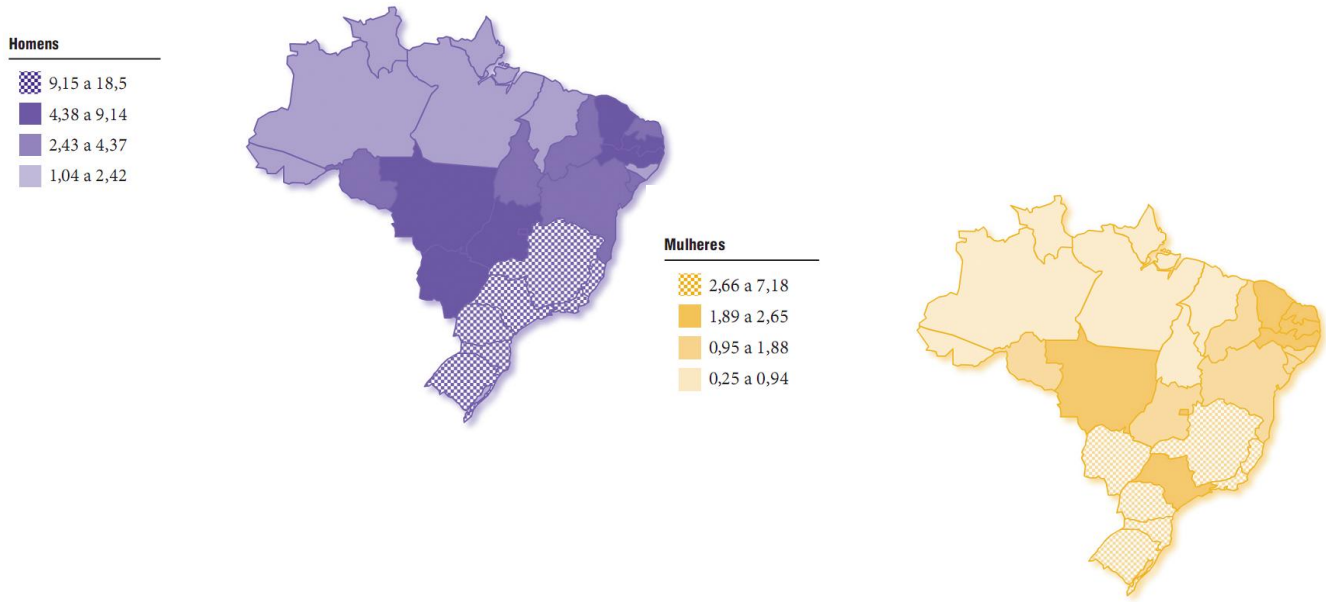


Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de tumores de esôfago por 100 mil homens e 100 mil mulheres para o ano de 2010 no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde / INCA.

O consumo de tabaco e álcool destaca-se como importante fator primário de risco para o desenvolvimento do CEE. A alimentação deficiente em vitaminas e minerais, resultante diretamente de uma baixa condição sócio-econômica ou indiretamente associada ao alcoolismo, representa uma condição comum a todas as áreas onde é observada uma elevada incidência do CEE (CRADDOCK, C. 1993). A injúria crônica térmica, decorrente do consumo de bebidas em elevadas temperaturas, representa outro fator de risco importante para desenvolvimento do CEE (ISLAMI, F. *et al*., 2009), estando presente nas áreas de alta incidência dessa malignidade no mundo, como Iran (SEPEHR, A. *et al*., 2001 e BIRAMIJAMAL, F. *et al*., 2001), China (WU, M. *et al*., 2009), Japão (LAMBERT, R. *et al*., 2004), Índia (AKHTAR, S.S., 2009), Normandia (LANOY, E. *et al*., 1997), Sul do Brasil, Uruguai e Nordeste da Argentina (CASTELLSAGUÉ, X. *et al*., 2000).

Para o ADE, o fumo foi identificado como fator de risco, mas o álcool mostrou estar pouco relacionado (BLOT, W. J. e McLAUGHLIN, J. K., 1999; TOH, Y. *et al*., 2010). Além disto, existem condições clínicas pré-disponentes para o desenvolvimento do ADE. O esôfago de Barrett, uma alteração tecidual na qual o epitélio distal esofágico é substituído por um epitélio colunar metaplásico, é considerado como uma condição pré-maligna para o adenocarcinoma (DENT, J., 2011). O refluxo gastro-esofágico crônico já foi descrito como o principal fator patogenético para o desenvolvimento dessa alteração (SHAHEEN, N.J. E RICHTER, J.E., 2009, SHARMA, P., 2009; SPECHLER, S.J. *et al*., 2010) e cerca de 0,5% a 1% de pacientes com metaplasia de Barrett desenvolvem o ADE (REYNOLDS, J.C. *et al.,* 1999).

Além dos fatores ambientais, a susceptibilidade genética provavelmente está envolvida no desenvolvimento do câncer de esôfago. Diversos estudos (MORITA, S. *et al*., 1997; NIMURA, Y. *et al*., 1997; VAN LIESHOUT, E. M. *et al*., 1999; ROTH, M. J. *et al*., 2000; ROSSINI, A. M. *et al*., 2007) tem investigado possíveis correlações entre o desenvolvimento desse tipo de tumor e polimorfismos em genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo e detoxificação de agentes exógenos ou aspectos relativos ao reparo de DNA. Devido às altas taxas de mortalidade dos tumores de esôfago no mundo, a caracterização das alterações genéticas e moleculares ocorridas durante a progressão da doença seria de grande importância para a identificação de marcadores que, associados aos fatores etiológicos poderiam ser alvo de quimioprevenção ou detecção precoce desses tumores.

TP53

O gene supressor de tumor *TP53* desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular e manutenção da estabilidade genômica, atuando através de diversas vias com o objetivo de impedir o acúmulo de mutações. Dessa forma, ele é conhecido como “master gene” ou “guardião do genoma” (LU, C. e El-Deiry, W. S., 2009) e é um alvo muito interessante no entendimento dos processos de carcinogênese. O *TP53* é o gene supressor de tumor mais alterado em tumores sólidos, apresentando-se mutado em cerca de metade dos casos de cânceres humanos (HOLLSTEIN, M. *et al*.,1991; GREENBLATT, M. S. *et al*., 1994). As alterações mais comuns nesse gene incluem perda de alelos, mutações pontuais e

inativação da proteína (GUIMARÃES, D. P. e HAINAUT, P., 2002). O amplo espectro de mutações nesse gene permite identificar as possíveis fontes geradoras das mesmas devido às “impressões digitais” características de cada tipo de dano deixadas no DNA (HAINAUT, P. *et al*., 1998).

O *TP53* está localizado no cromossomo 17p13 e contém 11 exons. As mutações em *TP53* geralmente não são distribuídas randomicamente, com regiões “*hotspot”* já demonstradas. As mutações nesse gene estão distribuídas em todos os exons codificantes, mas a maior concentração ocorre nos exons 4-9, que codificam o domínio de ligação ao DNA da proteína. Já foram descritas seis regiões *“hotspot”* para mutações em *TP53,* sendo 5 delas representadas por citosinas localizadas em seqüências CpG (GUIMARÃES, D. P. e HAINAUT, P., 2002).

O gene *TP53* codifica a fosfoproteína nuclear p53 que age como fator de transcrição. Ela consiste de 393 aminoácidos e é comumente dividida em três porções que contém os domínios funcionais (Figura 3). A porção amino-terminal, contendo o domínio de transativação; a porção central onde localiza-se o domínio de ligação ao DNA e a porção carboxi-terminal que contém os domínios de oligomerização e regulação (BODE, M. A. e DONG, Z., 2004).

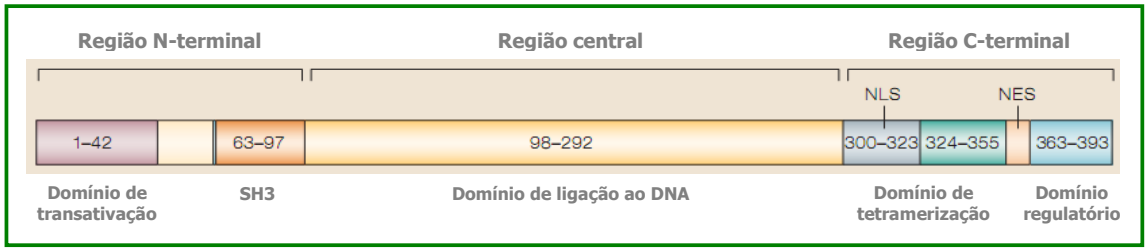


Figura 3: Esquema ilustrativo dos três diferentes domínios funcionais da p53 (Adaptado de BODE, M. A. e DONG, Z., 2004)

A proteína p53 é expressa em virtualmente todos os tecidos como uma proteína constitutivamente reprimida. Diversos sinais de *stress* podem levar à desrepressão da p53 (Figura 4) e ao seu acúmulo por modificações pós-traducionais (GUIMARÃES, D. P. e HAINAUT, P., 2002). Uma vez ativada, a p53 modula múltiplas funções celulares como: transcrição gênica, síntese e reparo de DNA, parada do ciclo celular, senescência e apoptose (HUSSAIN, S. P. e HARRIS, C.C., 2006). A p53 regula todos esses processos através da regulação transcricional e modulação de

outras proteínas por interação direta. A p53 representa um ponto de convergência para várias vias de resposta ao *stress* sofrido pelas células.

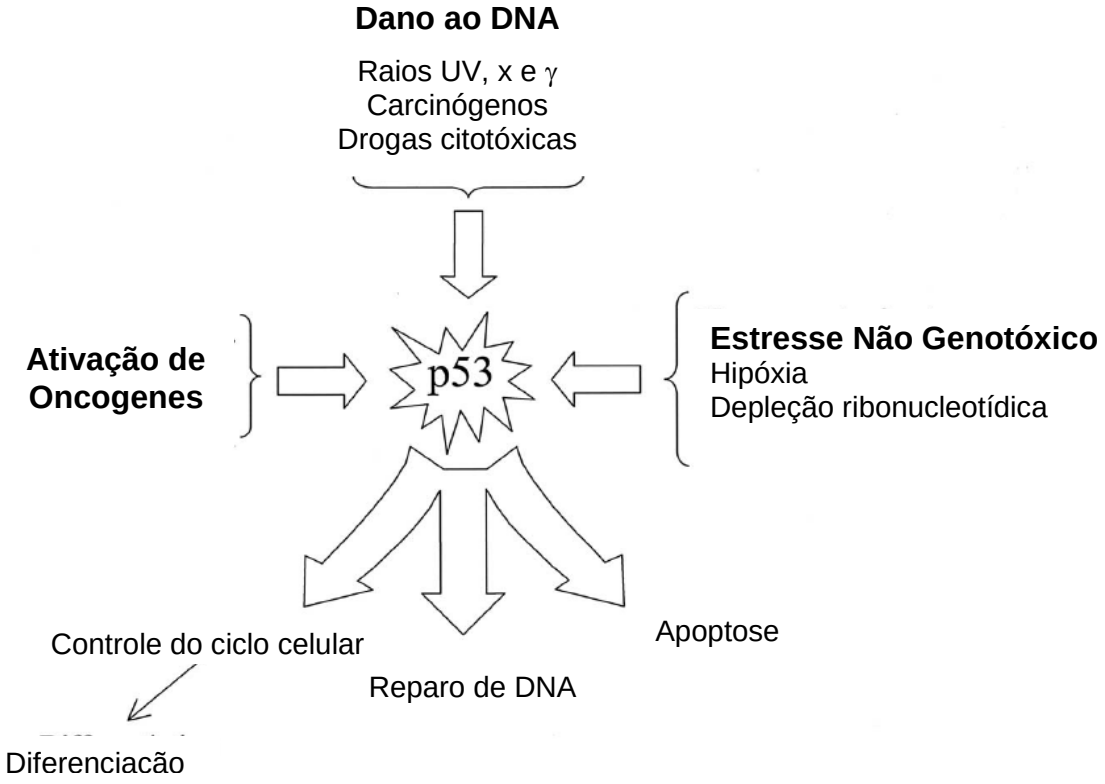


Figura 4: Visão sintética da via p53 com as três classes de sinais ativadores de p53 representados (Adaptado de GUIMARÃES, D. e HAINAUT, P., 2002)

TP53 e Câncer de Esôfago

As alterações mais freqüentes nos tumores de esôfago são as mutações no gene supressor de tumor *TP53*. Este tipo de câncer apresenta a segunda maior incidência de mutações neste gene. Cerca de 40% dos CEE e 70% dos ADE apresentam mutações no gene *TP53* e essas alterações aparecem precocemente durante a progressão neoplásica desses tumores. No CEE, evidências da ocorrência precoce de mutação em *TP53* são baseadas na detecção de mutações do gene em áreas de mucosa adjacente ao tumor e de displasia (MANDARD, A. M. *et al*., 2000). Já para o ADE, foi demonstrada a presença de mutações na lesão precursora do epitélio de Barrett e nas áreas de displasia que precedem o ADE (CHAO, D. L. *et al*., 2008).

Os dois principais tipos histológicos de tumores esofágicos apresentam freqüência, tipo e localização de mutações pontuais em *TP53* distintos (MONTESANO, R. *et al*., 1996; 1998). Uma vez que determinados carcinógenos podem provocar mutações características no gene *TP53* (impressões digitais), a análise das alterações neste gene pode sugerir os carcinógenos que efetivamente contribuíram para a transformação maligna observada.

A maior parte das mutações do gene *TP53* em carcinoma epidermóide (31%) são em bases A:T, sugerindo a ação de compostos genotóxicos de origem externa. Dessa forma, o tabaco, especialmente por causa de nitrosaminas e do benzo[a]pireno, potencializado por outros fatores como álcool ou metais, vírus, alimentação, clima ou susceptibilidade genética, pode estar relacionado às alterações encontradas (BLOT, W. J. e McLAUGHLIN, J. K., 1999).

No adenocarcinoma, as mutações são majoritariamente (69%) transições G:C>A:T em dinucleotídeos CpG, sendo o câncer que apresenta a maior quantidade destas mutações. Estas mutações possivelmente surgem espontaneamente, a partir de desaminação hidrolítica da 5-metilcitosina, influenciada ou não por compostos oxidantes, ou da desaminação enzimática e metilação catalisada por metiltransferases, sugerindo assim a perda da homeostase normal do tecido (MONTESANO, R. *et al*., 1996; 1998).

O Norte do Irã, conforme dito anteriormente, é uma área de alta incidência de CEE. Em 2001, foram realizados dois estudos colaborativos entre cientistas iranianos e os grupos de pesquisa conduzidos pelo Dr. Hainaut (SEPEHR, A. *et al*., 2001) e pela Dra. Hollstein (BIRAMIJAMAL, F. *et al*., 2001), nos quais foram obtidos resultados inesperados. Em contraste com os 10% de mutações em ilhotas CpG do gene *TP53* descritas para amostras deste tumor provenientes da Europa Ocidental, uma alta proporção (33%) de transições G para A em ilhotas CpG foram encontradas nas amostras iranianas. Além disso, amostras de CEE do Sul do Brasil, outra região de alta incidência, apresentaram uma freqüência de 18% de mutações em sítios CpG do *TP53* (PUTZ, A. *et al.*, 2002). Nos resultados iranianos, 16,5% das amostras mutadas em ilhotas CpG do *TP53* apresentavam uma segunda mutação nesse mesmo gene, sendo 38% destas em ilhotas CpG. O estudo conduzido com as amostras do Sul do Brasil reportou 2 duplas mutações em 49 amostras mutadas, sendo uma delas em CpG.

Transição G para A em CpG

As transições de G para A compreendem uma das classes de mutação mais freqüentes encontradas em células cancerosas humanas. Cerca de 24% das mutações em *TP53* são transições G para A em seqüências CpG (WATERS, T. e SWANN, P., 2000), bem como 23% das mutações encontradas em todas as doenças hereditárias humanas (KRAWCZAK, M. *et al.*, 1998) e 24% dos polimorfismos humanos de um único nucleotídeo (TOMSO, D. J. e BELL, D. A., 2003). Isso sugere que o mecanismo envolvido no reparo desse tipo de mutação é bastante importante e que seu bom funcionamento é essencial.

Essas mutações são provenientes de malpareamentos G•T. Esses malpareamentos ocorrem porque a maioria das citosinas em sítios CpG do genoma humano são metiladas na posição 5' por um mecanismo pós-replicativo catalisado por DNA metiltransferases, formando a 5-metilcitosina. A 5-metilcitosina é menos estável do que a citosina e sofre desaminação espontânea, gerando uma timina, com uma taxa 5 vezes maior do que a base não-metilada. A desaminação da 5-metilcitosina é a desaminação mais freqüente em bases do DNA e ocorre espontaneamente, na freqüência de 100 vezes por dia em uma célula humana (LIVNEH, Z., 2001). Os dinucleotídeos CpG sofrem mutações numa taxa 10 vezes maior do que os outros nucleotídeos, gerando transições G:C > A:T (KUMAR, S. e SUBRAMANIAN, S., 2002; HOLLIDAY, R. e GRIGG, G. W., 1993).

Reparo de DNA

O DNA e outros componentes celulares estão sob constante ataque de metabólitos reativos gerados por processos fisiológicos, bem como por agentes químicos, físicos e infecciosos presentes no meio-ambiente, podendo levar ao aparecimento de alterações na estrutura química da molécula original: as mutações. Estima-se que cada célula humana sofra dano no seu DNA na taxa de 10^6 lesões por dia (LODISH, H. F., 2003). Durante as primeiras décadas após seu descobrimento, o DNA era considerado altamente estável. Entretanto, atualmente podemos dizer que sua estrutura é variável, está em constante mudança e é estabilizada por processos biológicos ativos que mantêm a fidelidade de replicação dessa molécula: os mecanismos de reparo de DNA. Assim, um nível controlado de mutagênese é

considerado importante para permitir modificações evolucionárias. Por outro lado, evitar o aparecimento de mutações é essencial para a viabilidade celular.

As alterações químicas sofridas pelo DNA são diversas e provenientes de três causas principais: espontâneas, causadas por produtos do metabolismo celular ou por agentes ambientais. As lesões espontâneas são provenientes da instabilidade inerente das ligações químicas específicas dos nucleotídeos em condições fisiológicas de temperatura e pH. Dentre os produtos do metabolismo celular, podemos destacar as espécies reativas de oxigênio provenientes do processo de respiração celular. As lesões oriundas de agentes ambientais resultam da interação da molécula do DNA com agentes físicos e compostos químicos presentes no meio-ambiente (HOEIJMAKERS, H. J. J., 2001). Tanto as bases quanto os açúcares e ligações fosfodiésteres, componentes primários do DNA, estão sujeitos às alterações químicas, mas uma maior atenção é dispensada às lesões sofridas pelas bases, que são os elementos informativos do código genético.

Existe uma diversificada gama de sistemas de reparo de DNA que visa assegurar a estabilidade do DNA e sua fidelidade de duplicação, através da identificação e correção dos danos ao DNA. As vias de reparo são altamente conservadas em diferentes organismos, sugerindo que seu surgimento deve ter ocorrido em fase inicial do processo evolutivo. Já foram identificados diversos mecanismos de reparo de DNA em células humanas e seus mecanismos são parcialmente conhecidos. O funcionamento adequado do sistema de reparo de DNA em células humanas é essencial para a integridade do genoma e do organismo. Carcinogênese, envelhecimento precoce, síndromes genéticas e diminuição da expectativa de vida são associados a uma diminuída capacidade de reparo de DNA (WESTON, A. e HARRIS, C. C., 2003). Muitos fatores interferem na taxa de reparo de DNA, tais como o tipo e a idade celular e o ambiente extracelular. Devido à grande importância das proteínas participantes do processo de reparo de DNA, elas são conhecidas como guardiãs do genoma e são consideradas supressoras de tumor (BARNES, D. e LINDAHL, T., 2004). A importância dessas vias é demonstrada pela alto risco de câncer proveniente de síndromes genéticas humanas (Quadro 1) que apresentam em comum deficiência em alguma via de reparo de DNA, como a Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, Xeroderma pigmentoso, entre outras (COSTA, R. e MENCK, C., 2004).

Em células que apresentam dano não–letal ao DNA, a progressão do ciclo celular é impedida num processo altamente coordenado envolvendo diversos passos que culminam com a ativação dos mecanismos de reparo. As lesões ao DNA disparam uma cascata transdutora de sinais que ativa os pontos de checagem,

pausando o ciclo celular e permitindo à célula reparar o dano, através de mecanismos específicos de reparo de DNA para cada fase do ciclo celular, antes que o processo de divisão celular seja retomado (BRANZEI, D. e FOIANI, M., 2008). Os pontos de checagem de dano ao DNA ocorrem no limite das fases G1/S e G2/M, além de ocorrer na fase S. Duas quinases – ATM e ATR – são responsáveis pelo controle desses pontos de checagem e respondem a diferentes estímulos: ATM é ativada pela quebra de fitas-duplas e ruptura na estrutura da cromatina (BAKKENIST, C. J. e KASTAN, M. D., 2003), enquanto que a ATR é responsiva à parada nas forquilhas de replicação. Essas quinases ativam alvos *downstream* através de fosforilação, disparando uma cascata de transdução de sinais que leva à parada do ciclo celular (WEI, M. X., 2007).

Quadro 1: Síndromes humanas provenientes de deficiências em vias de reparo de DNA relacionadas à incidência de determinados tipos de tumores

Doença	Sensibilidade	Suscetibilidade ao câncer	Sintomas	Enzimas ou processo afetado	Referência
Xerodema pigmentoso	UV,purina alquilada	Carcinoma de pele (↑ 10^3 vezes na incidência)	Fotossensibiidade de pele e olhos	Reparo por excisão de nucleotídeos	FELLER, L. *et al*., 2010
Ataxia telangiectasia	Radiação gama	Linfoma (70% dos casos)	Ataxia; dilatação de vasos sanguíneos na pele e nos olhos	Proteína quinase ATM	TICHY, A. *et al*., 2010
Anemia de Fanconi	Agentes que afetam a ligação cruzada do DNA	Leucemias (20% dos casos)	Pancitopenia hipoblástica; anomalias congênitas	Reparo de DNA cruzado interfitas	D'ANDREA, A. D., 2010
Síndrome de Bloom	UV	Leucemias e outros tipos de câncer (↑ 150-300 vezes na incidência)	Fotossensibilidade; mudanças faciais	DNA-helicase acessória para replicação	TIKOO, S. e SENGUPTA, S., 2010

O reparo de DNA envolve reações responsáveis pela remoção do dano causado, seguidas por reações de incorporação de base mediadas pelas polimerases. Os principais mecanismos de reparo de DNA possuem diversos complexos multiprotéicos e toda a maquinaria necessária para desempenhar eficientemente suas funções e podem ser agrupados em 4 classes principais: reversão da lesão, excisão da lesão, recombinação homóloga e junção de extremidades (POIRIER, M. C. e WESTON, A., 2002; YU, Z. *et al*., 1999).

Reparo por excisão de bases (BER – *base excision repair*)

A via BER é a principal via de reparo de bases mutagênicas de DNA causadas por uma grande variedade de agentes oriundos de processos celulares como oxidação e alquilação (BARNES, D. e LINDAHL, T., 2004). As DNA-glicosilases iniciam a via através do reconhecimento da lesão e clivagem da ligação N-glicosil, que mantém a base nitrogenada associada ao esqueleto açúcar – fosfato, gerando um sítio abásico (FRIEDBERG, E. C., 1995). O segundo grupo de enzimas participantes da via, as AP-endonucleases, reconhecem o sítio abásico e catalisam a incisão da ligação fosfodiéster no sítio básico formado. Por fim, a lacuna é preenchida através da polimerização e ligação do novo nucleotídeo à seqüência em questão (Figura 5) (CADET, J. *et al*., 2000). As etapas que compreendem o BER são as mesmas para o reparo dos diversos tipos de lesões e estão descritas acima, entretanto, as DNA glicosilases mudam de acordo com o dano causado à base. A maioria das glicosilases reconhece lesões específicas. As principais glicosilases encontradas em células de mamíferos são: TDG, MBD4, UNG, SMUG1, e hOGG1. Elas diferem em alguns mecanismos de ação e parâmetros cinéticos e, principalmente, na especificidade pelo substrato (MURALIDHAR, H. *et al*., 2010).

Timina–DNA Glicosilase (TDG)

A enzima Timina-DNA Glicosilase (TDG) pertence a uma grande família de proteínas conservadas e largamente distribuídas, que compartilham uma mesma estrutura de enovelamento α/β e habilidade geral de excisão de uracil do DNA: as Uracil-DNA glicosilases (UDG) (ARAVIND, L e KOONIN, E. V., 2000). Todas as UDGs

empregam o mesmo mecanismo de reconhecimento e ligação ao substrato e catalisam a hidrólise da ligação N-glicosídica da base a ser reparada, gerando um sítio abásico no DNA (SCHÄRER, P e JIRICNY, J., 2001). Entretanto, pequenas variações na arquitetura do sítio ativo e no mecanismo catalítico dessas enzimas definem três subfamílias com propriedades distintas: UNG, MUG e SMUG. Nenhuma das subfamílias está presente em todas as espécies, entretanto, as UNG e MUG apresentam maior distribuição podendo ser encontradas desde bactérias até humanos e as SMUG ocorrem exclusivamente em organismos eucarióticos multicelulares (ARAVIND, L e KOONIN, E. V., 2000).

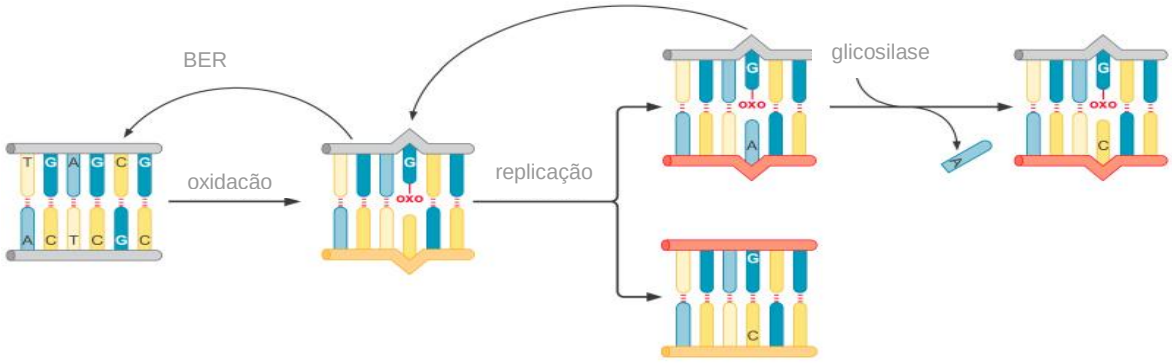


Figura 5: Figura esquemática da via de Reparo de DNA por Excisão de Base (BER) (Adaptado de http://paper6.tistory.com/49)

A TDG foi o primeiro membro descrito da subfamília de uracil-DNA glicosilases *mismatches* – específicas (MUG), entretanto, a família foi nomeada dessa forma após a descrição da proteína Mug de *Escheria coli*, referindo-se ao fato do processamento de uracil, mais do que o de timinas, ser uma característica comum dessas proteínas. As proteínas MUG apresentam uma arquitetura simples, composta do domínio catalítico central conservado entre todas as UDGs e de extensões não conservadas amino- e carboxi-terminais de comprimentos variáveis (CORTÁZAR, D. *et al*., 2007) (Figura 6). As diferenças na composição e configuração dos domínios terminais não conservados são relacionadas com mudanças na especificidade de substratos, interação com os substratos e cinética de liberação da base (GALLINARDI, P. e JIRICNY, J., 1996; HARDELAND, U. *et al*., 2003; O'NEILL, R. J. *et al*., 2003 e STEINACHER, R. e SCHÄR, 2005).

A TDG processa tanto uracil quanto timina, mas somente quando estas bases encontram-se malpareadas com guanina (WATERS, T. e SWANN, P., 1998). Os malpareamentos G•U e G•T são originados, principalmente, como conseqüência da desaminação espontânea da citosina e da 5-metilcitosina, respectivamente, e, se não

forem reparados, dão origem às transições G para A. Portanto, a TDG é responsável por iniciar o BER desses malpareamentos em sitios de desaminação de citosina e 5-metilcitosina no DNA (HARDELAND, U. *et al*., 2003), ocorridos exclusivamente em ilhotas CpG (WATERS, T. e SWANN, P., 1998).

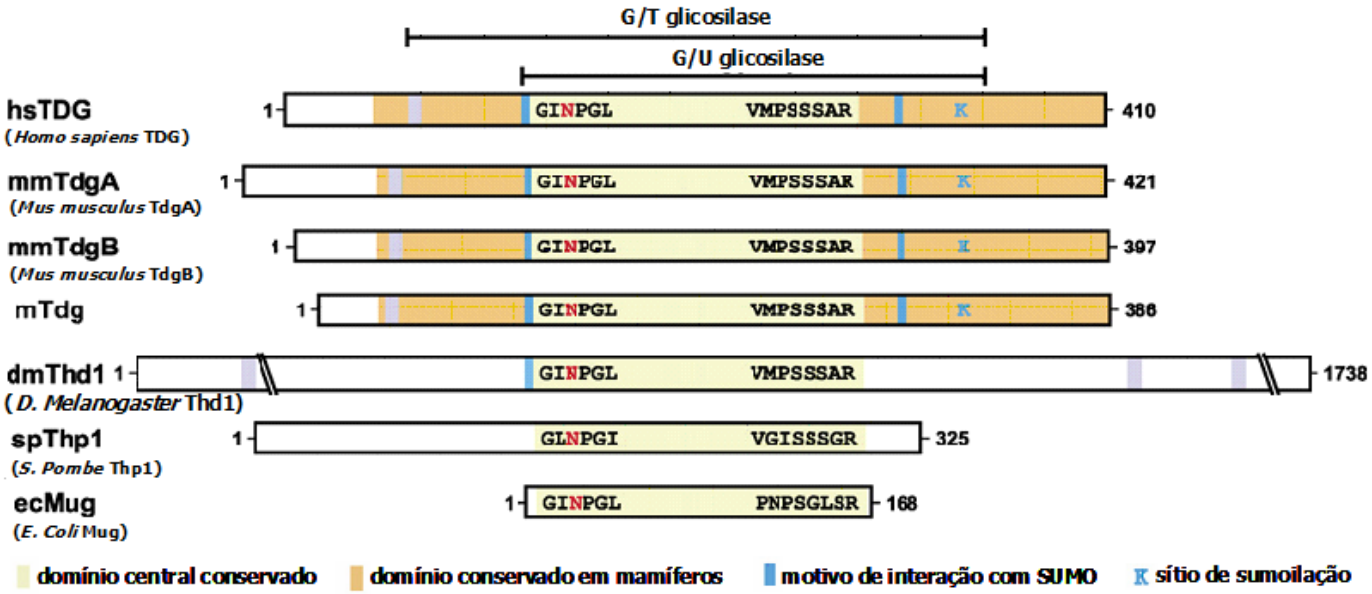


Figura 6: Esquema do alinhamento das proteínas MUG (Adaptado de CORTÁZAR, D. *et al*., 2007).

Análises mutacionais da TDG demonstraram que o domínio central conservado em todas as proteínas UDG é suficiente para o processamento de substratos G•U, entretanto, o reparo de timinas provenientes de malpareamentos, requer também a presença da seqüência amino-terminal (HARDELAND, U. *et al*., 2000 e GALLINARDI, P. e JIRICNY, J., 1996). Além disso, já foi descrito que a substituição de uma asparagina por uma alanina no sítio catalítico (N140A) resulta na enzima que mantêm preservada a capacidade de ligação aos substratos malpareados, mas é incapaz de catalisar a remoção da base. Outra mutação, ocorrida em um motivo com papel definido na interação proteína-substrato (Met-269), inativa a ligação estável entre a TDG e seu substrato, sem, entretanto, ocasionar a perda da atividade de glicosilase da enzima (HARDELAND, U. *et al*., 2000).

Esta enzima possui outros substratos além da timina e do uracil. Ela repara, também, malpareamentos G•3,N4-etenocitosina, G•Tg (timina glicol), entre outros. Entretanto, já foi comprovada que a principal função da TDG na célula é o reparo dos malpareamentos G•T em ilhas CpG (ABU, M. e WATERS, T., 2003). A ligação particularmente forte da TDG com seu substrato resulta em um *turnover*

extremamente baixo da enzima: cada molécula de TDG praticamente só consegue processar um malpareamento G•T, devido ao fato do tempo de dissociação da enzima ser de aproximadamente 10 horas. A base que flanqueia a região 5' do malpareamento G•T reparado pela TDG, influencia na velocidade da taxa de remoção da timina. A remoção da timina acontece de forma mais rápida quando o malpareamento G•T é flanqueado na região 5' por um par de bases C•G, sugerindo que, o rápido processamento desse substrato requer contato entre a enzima e a guanina malpareada, bem como com o par de bases C•G flanqueando a região 5' (WATERS, T. e SWANN, P., 1998).

Após a clivagem da ligação base-açúcar, a TDG se liga com alta afinidade ao sítio abásico gerado, até ser deslocada pela segunda enzima da via de reparo, a endonuclease apurínica APEX, que catalisa a quebra da ligação fosfodiéster 5' no sítio abásico. Aumento na concentração da APEX agiliza o deslocamento da TDG e, conseqüentemente, a eficiência do processo (WATERS, T., 1999). A APEX, por sua vez, continua no local até ser deslocada pela polimerase-β (BENNETT, W. P. *et al*., 1997), que remove o esqueleto açúcar-fosfato e preenche a lacuna deixada com a base de origem. Por fim, a DNA ligase III associada à proteína XRCC1 liga a nova base à fita de DNA, completando, assim, o reparo (WATERS, T., 1999). A função da XRCC1 nesse processo ainda não é bem estabelecida, mas já foi sugerido que ela funcione como a ligação entre a DNA polimerase-β e a DNA ligase III, uma vez que essas enzimas não interagem diretamente (LINDAHL, T., 2000) ou, ainda, que ela aja de forma a garantir que a DNA polimerase-β adicione apenas um nucleotídeo (WATERS, T. *et al*., 1999). A figura 7 ilustra as etapas do processo.

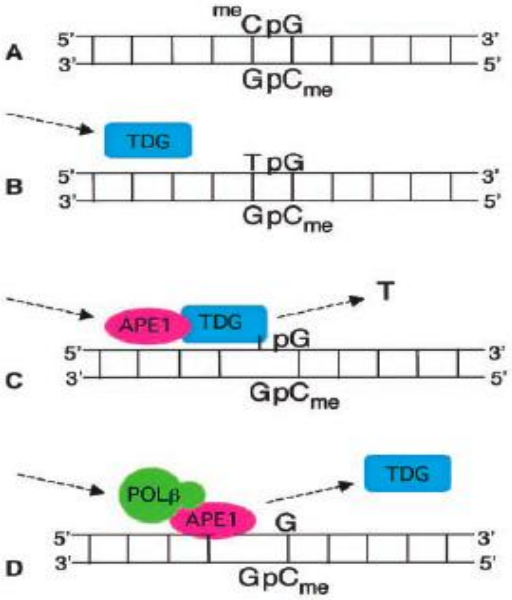


Figura 7: Via BER para reparo de malpareamentos G:T em sítios CpG iniciada pela TDG (Adaptado de LINDAHL, T. e WOOD, W., 1999)

A busca por proteínas que interagem com a TDG humana levou ao isolamento das pequenas proteínas modificadoras ubiquitina-*like* (SUMO) (MINTY, A. *et al*., 2000 e HARDELAND, U. *et al*., 2002). As proteínas SUMO são polipeptídeos estruturalmente relacionados à ubiquitina que interagem e/ou são ligados a outras proteínas. Os mecanismos envolvidos nas modificações covalentes causadas pelas SUMO (SUMOilação) são similares à ubiquitinação, porém, requerem suas próprias enzimas conjugadoras E1, E2 e E3 (HAY, R. T., 2005). A interação das proteínas SUMO com as suas proteínas alvo pode afetar numerosos processos biológicos, tais como localização celular, estabilidade protéica (CORTÁZAR, D. *et al*., 2007), transdução de sinais na célula (GILL, G., 2004), regulação transcricional gênica e manutenção da integridade genômica (HENDRICH, B. *et al*., 1999).

A TDG é pós-traducionalmente modificada pela conjugação covalente às proteínas SUMO (HARDELAND, U. *et al*., 2000). A modificação causada pela SUMO induz uma mudança conformacional no domínio amino-terminal da TDG que reduz a afinidade geral de ligação da enzima ao DNA (STEINACHER, R e SCHÄR, P., 2005). A mudança conformacional é mediada pela interação da SUMO com a região carboxi-terminal da TDG (resíduos 307-330). Conforme dito anteriormente, a alta afinidade da TDG pelo substrato resulta em um *turnover* extremamente baixo da enzima e o processo de SUMOilação, por diminuir a afinidade de ligação ao DNA, acelera o processo de liberação da enzima e permite a sua “reciclagem” para catalisar uma nova reação (Figura 8). Dessa forma, o reparo de malpareamentos G•U, que não necessita de alta afinidade de ligação da TDG ao DNA, continua a ser processado mesmo quando a enzima encontra-se ligada a SUMO, entretanto, o processamento de G•T, que requer uma forte ligação da enzima ao DNA mediada pelo domínio amino-terminal da enzima, não ocorre quando a TDG está SUMOilada (STEINACHER, R e SCHÄR, P., 2005).

A TDG interage com diversas proteínas além da APEX e das proteínas SUMO. Inicialmente esta enzima foi descrita como uma proteína que interagia com o fator transcricional *jun* (CHEVRAY, P. M. e NATHANS, D.,1992) e, somente depois, foi descrita como uma DNA-glicosilase. Desde então, já foi reportada sua interação com receptores do ácido retinóico (UM, S. *et al*., 1998), receptores dos hormônios tireoideanos (MISSERO, C. *et al*, 2001), receptores de estradiol (JOST, J. P. *et al*., 2002), receptores de estrogênio (CHEN, D. *et al*., 2003) e proteínas ligadoras de CREB (CBP) (TINI, M. *et al*, 2002). No mesmo estudo onde foi descrita a interação entre a TDG e as CBP, foi demonstrado também que essas proteínas podem modular a interação entre a TDG e a APEX, regulando, assim, o segundo passo nessa via de reparo (TINI, M. e*t al*, 2002).

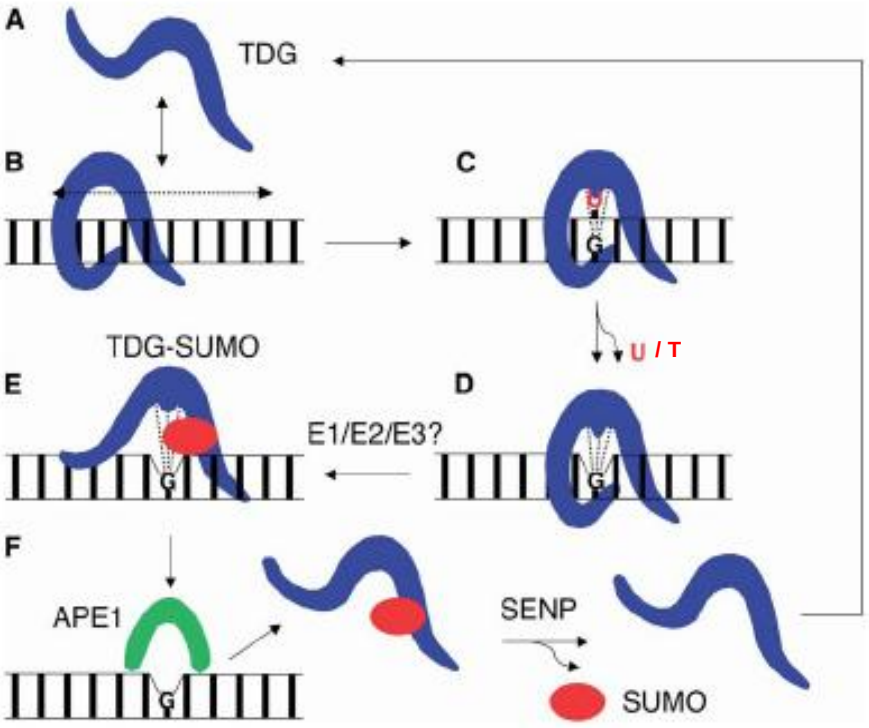


Figura 8: Esquema representativo do processo de SUMOilação da TDG (Retirado de STEINACHER, R e SCHÄR, P., 2005)

O gene da *TDG* possui 10 exons e está localizado no cromossomo 12q24.1, uma região que apresenta freqüente perda de heterozigosidase em câncer gástrico (SCHMUTTE, C. *et al*., 1997) e pancreático (YATSUOKA, T. *et al*., 1999), que apresentam alta proporção de mutações G para A em sítios CpG. Os níveis de expressão de RNAm da *TDG* são similares em virtualmente todos os tecidos, embora já tenha sido descrita uma maior expressão no timo (tecido com maior ocorrência de 5-metilcitosina) (SCHMUTTE, C. *et al*., 1997). Além disso, em um estudo com embriões de camundongo foi demonstrada uma expressão particularmente alta da *TDG* em alguns tipos celulares, principalmente em células que se dividem rapidamente, durante determinados estágios do desenvolvimento (NIEDERREITHER, K. *et al*., 1998). Seis polimorfismos de base única (SNPs) foram descritos para a TDG: Gly199Ser, Val367Leu, Val367Met, Ala374Thr, Gly 381Glu e Ser396Asn (NCBI database). Apenas um desses mutantes foi testado (Gly199Ser) e não demonstrou perda da atividade de glicosilase da enzima (SARD, L. *et al*., 1997), entretanto, essa variante foi correlacionada a um aumento na freqüência de micronúcleos, sugerindo que, embora a atividade enzimática permaneça inalterada, esse polimorfismo deve

afetar a interação da TDG com outras proteínas diminuindo a capacidade global de reparo (LU, C. e El-DEIRY, W.S., 2009).

Existe uma outra enzima capaz de remover a timina de malpareamentos G•T em ilhas CpG, a MBD4, que é parte da família de proteínas que apresentam um domínio de ligação ao DNA-metilado (HENDRICH, B. *et al*., 1999). Além do domínio de ligação a sítios CpG metilados, a MBD4 tem um domínio glicosilase separado. Camundongos *knockout* para TDG não são viáveis, porém, camundongos *knockout* para MBD4 são viáveis e apresentam uma taxa de transições G para A em ilhas CpG apenas 3 vezes maior do que camundongos controle (MILLAR, C. B. *et al*., 2002; WONG, E. *et al*.,2002). Este modesto aumento nas taxas de mutações sugere que os camundongos *knockout* para MBD4 continuam reparando a maioria dos *mismatches* G•T em CpG provenientes da desaminação da 5-metilcitosina, utilizando um sistema de reparo não dependente de MBD4. Existe uma importante diferença de localização celular entre as duas enzimas: a MBD4 está localizada junto à heterocromatina, enquanto que a TDG está associada à eucromatina transcricionalmente ativa (TINI, M. *et al*., 2002).

TP53 e Reparo de DNA

A modulação das vias de reparo de DNA pela proteína p53 ocorre principalmente através da ativação transcricional de seus genes alvo (ADIMOOLAM, S. e FORD, J. M., 2003; SENGUPTA, S e HARRIS, C. C., 2005). Bocangel e colaboradores (2009) mostraram que p53 diminui os níveis de expressão da enzima de reparo de DNA O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), que catalisa a desalquilação da O(6)-alquilguanina gerada por quimioterápicos, potencializando o efeito dos quimioterápicos nas células tumorais. A p53 também ativa o gene de reparo de malpareamentos *MSH2* em sinergismo com o fator de transcrição c-Jun, em resposta ao dano ao DNA causado por irradiação UV (SCHERER, S.J. *et al*., 2000).

A interação entre a p53 e o reparo de DNA tem sido descrita mais largamente para as vias NER e BER. Já foi descrito que a p53 afeta o reparo NER através da ativação transcricional de genes efetores desse tipo de reparo como o gadd45a e o p48-XPE (SEO, Y. R. e JUNG, H. J., 2004). Além disto, a p53 está envolvida diretamente no reparo de DNA (EVANS, M. K. *et al*., 1993; WANG, X. *et al*., 1995; HANAWALT, P. C., 2002). Sabe-se que a proteína p53 se liga às DNA–helicases XPB

e XPD no complexo TFIIH e modula as funções de reparo por excisão de nucleotídeos excercidas por essas enzimas, sugerindo um papel direto na modulação dessa via de reparo (WANG, X. *et al*., 1995).

Recentemente, alguns trabalhos têm descrito a interação ente a p53 e a via BER de reparo de DNA (SMITH, M. L. e SEO, Y. R., 2002; SEO, Y. R. e JUNG, H. J., 2004; SOUZA-PINTO, N. C. *et al*., 2004). Assim como para a via NER, a p53 também atua na via BER através de um processo independente de transcrição, envolvendo a interação direta entre a p53 e a maquinaria BER (SENGUPTA, S e HARRIS, C. C., 2005; ZURER, I. *et al*., 2004). Já foi descrita a interação física direta entre a p53, a polβ e a APE1, através da estabilização da polβ nos sítios abásicos mediada por p53 (ZHOU, J. *et al*., 2001; JAYARAMAN, L. *et al*., 1997). Já foi reportada, também, a regulação transcricional de uma das DNA glicosilases participantes do reparo BER, a enzima humana 8-oxoguanina glicosilase (hOGG1), pela p53 (CHARTTERJEE, A. *et al*., 2005). A hOGG1 é responsável por reparar a base modificada 7,8-diidro-8-oxoguanina que pareia erroneamente com adenina e citosina. Utilizando sistemas celulares mutantes e silenciamento para *TP53*, Chatterjee e colaboradores (2005) demonstraram que a p53 se liga na região promotora do gene *hOGG1* e modula a atividade e expressão desta enzima, com a inibição da p53 levando a uma atividade e expressão deficiente de hOGG1. Além disso, Seo e colaboradores (2002) demonstraram que a expressão de polβ é diminuída em linhagens celulares deficientes em p53.

A figura 9 abaixo esquematiza os possíveis papéis da p53 nas vias NER e BER.

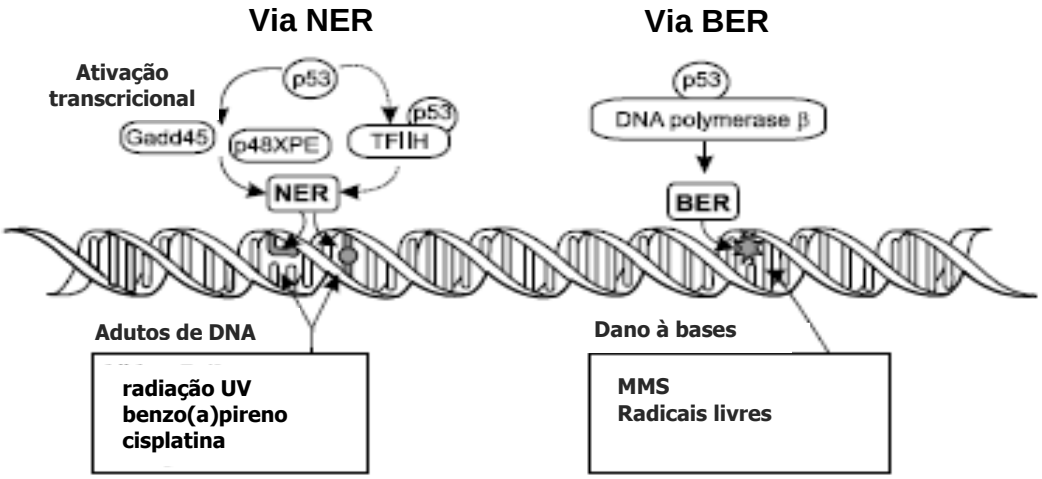


Figura 9: Funções potenciais para a p53 nas vias de Reparo de DNA por Excisão (BER e NER) (Adaptado de SEO, Y. R. e JUNG, H. J., 2004)

Assim, a alta proporção de mutações em sítios CpG em CEE provenientes de áreas de alta incidência, sugere que o sistema de reparo de DNA responsável pela correção dos malpareamentos que precedem o surgimento dessas mutações possa estar prejudicado. A observação de duplas mutações, sendo majoritariamente ao menos uma em CpG, gera a hipótese de que a primeira mutação em *TP53* reduz a atividade da via de reparo responsável pela correção da mutações em ilhotas CpG, possibilitando o surgimento da segunda mutação nessa região.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Objetivo geral**

- Demonstrar se a proteína supressora de tumor p53 regula a expressão e da enzima de reparo de DNA Timina DNA-Glicosilase.

1.2 **Objetivos específicos**

- avaliar a expressão da TDG em diferentes sistemas mutantes para *TP53*;
- avaliar a expressão da TDG após indução de dano ao DNA na presença ou ausência de p53 ativa;
- avaliar a ligação da p53 na região promotora do gene *TDG* e sua ativação;
- avaliar os efeitos da indução do dano ao DNA sobre a proliferação celular em células deficientes ou competentes para o reparo de DNA via TDG.
- Avaliar os níveis de expressão de mRNA da TDG em CEE com e sem mutação em *TP53*.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

2.1 **Amostras de carcinoma epidermóide de esôfago**

As amostras analisadas são constituídas por vinte e três pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma epidermóide de esôfago admitidos no hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS) e Gastrocentro do Hospital das Clínicas de Campinas (HC – Campinas/UNICAMP). As amostras e mucosas adjacentes foram seqüenciadas e nove delas foram identificadas como portadoras de mutação no gene *TP53* e quatorze como não portadoras de mutação nesse gene. As amostras foram coletadas através de exame de endoscopia digestiva ou procedimento cirúrgico no qual foi retirado um fragmento de tecido esofágico tumoral e da mucosa adjacente ao tumor, respeitando-se o limite de 5 cm da margem tumoral. Os pacientes não haviam sido submetidos a tratamento quimio e/ou radioterápico. Os dados epidemiológicos dos pacientes foram obtidos através de entrevista utilizando um questionário padronizado e os dados clinicopatológicos através da análise dos prontuários dos mesmos. A utilização das amostras foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética das respectivas instituições, e aos pacientes, que gentilmente concordaram em participar do estudo, foi solicitada assinatura de termo de consentimento livre informado.

2.2. **Linhagens celulares**

Neste estudo foram utilizadas as linhagens de células provenientes de carcinoma epidermóide de esôfago, TE-1 e TE-13, as linhagens celulares derivadas de câncer de mama, MN1 e MDD2, e uma linhagem celular de epitélio bronquial humano normal, NHBE, pertencentes ao laboratório do Dr. Pierre Hainaut (IARC, França). As linhagens celulares foram periodicamente testadas com MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Cambrex Bio Science, EUA) para a certificação de ausência de infecção por micoplasma.

2.2.1. TE-1

A linhagem celular TE-1 é derivada de carcinoma epidermóide de esôfago e apresenta uma mutação termo-sensível em *TP53,* representada pela troca de uma valina para uma metionina no códon 272 do gene (V272M) (BARNAS, C. *et al*., 1997). Quando as células são cultivadas à 37^{o}C, a maior parte da proteína p53 codificada assume uma conformação “mutante” e inativa que a incapacita de se ligar especificamente ao DNA e regular a expressão de maneira p53-dependente, enquanto que, as células mantidas na temperatura permissiva de 32^{o}C apresentam a maioria das proteínas codificadas numa conformação “selvagem” e ativa, desempenhando as funções normais de parada do ciclo celular na fase G1 e aumento na expressão de genes-alvo da p53. Essa linhagem celular já foi utilizada como um modelo para a identificação de genes regulados pela p53 num contexto de CEE (GUIMARÃES, D. *et al*., 2009; CORTES, U. *et al*., 2000). A TE-1 é cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (PAA) e 1% do coquetel de penicilina/glutamina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e foi mantida em estufa à 37^{o}C sob 10% de CO_2. Em um período mínimo de 8 horas antes da realização dos experimentos, as células utilizadas como controle, com a conformação “selvagem” da proteína, são mantidas à 32^{o}C.

2.2.2. TE-13

A TE-13 é uma linhagem celular originada de carcinoma epidermóide de esôfago deficiente em p53. Níveis muito baixos de RNAm de *TP53* são detectados nessas células e a seqüência codificante não apresenta mutação, entretanto, não há detecção da proteína p53, provavelmente devido a uma falha na transcrição ou processamento pós-transcricional (BARNAS, C. *et al*., 1997). O cultivo da TE-13 é feito em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (PAA) e 1% do coquetel de penicilina/glutamina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e mantidas em estufa à 37^{o}C e sob 10% CO_2.

2.2.3. MN1 e MDD2

As linhagens celulares MN1 e MDD2 são derivadas da linhagem de câncer de mama MCF-7 e expressam um peptídeo inibitório que bloqueia a oligomerização da p53. A MDD2 é transfectada com o peptídeo inibitório da oligomerização da p53 e a MN1 é transfectada com o mesmo peptído, mas sem a seqüência codificante, funcionando como uma cultura celular controle de p53 selvagem para MDD2. MN1 e MDD2 são cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (PAA), 1% do coquetel de penicilina/glutamina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e 0,4 mg/mL de geneticina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e mantidas em estufa à 37^{o}C e sob 5% CO_2.

2.2.4. NHBE

A linhagem celular NHBE (*Normal Human Bronchial Epithelial*) é uma linhagem primária, não transformada de células humanas provenientes do epitélio bronquial. As células NHBE são cultivadas em meio basal para células epiteliais bronquiais (Lonza), suplementado com 0,4% extrato bovino pituitário (BPE), 0,1% hidrocortisona, 0,1% fator de crescimento epidermal humano (hEGF), 0,1% epinefrina, 0,1% transferrina, 0,1% insulina, 0,1% ácido retinóico, 0,1% triiodotironina, 0,1% gentamicina/anfotericina B (GA-1000) (Lonza), à 37ºC sob 5% CO_2. Os experimentos foram realizados com células que encontravam-se na passagem 2-3.

2.3. **Tratamentos**

Os seguintes tratamentos foram realizados nas diferentes linhagens celulares utilizadas:

2.3.1. Inibição da Expressão Gênica do *TP53* e *TDG* pelo uso de RNA de Interferência (siRNA)

A expressão gênica do *TP53* e *TDG* foi inibida na linhagem celular TE-1 pelo uso de siRNA, seguindo as etapas descritas abaixo:

- cultivo de 3 X 10^5 e 2 X 10^5 células TE-1 / mL / poço em placas 12-poços à 32 e 37^{o}C, respectivamente, por 24 horas;

- incubação das amostras com um mix contendo água nas amostras controle ou siRNA controle ou anti-*TP53* ou anti-*TDG* nas amostras SCR, p53$^-$ e TDG$^-$, respectivamente, por 24 horas. O Mix é constituído de 93 μL de meio OptiMEM (PAA), 1 μL de água destilada ou de siRNA controle 20 μM ou de siRNA anti-*TP53* 20 μM ou 6 μL de siRNA anti-*TDG* 2 μM e 6 μL do reagente de transfecção HiPerfect (kit OR-KIT2-SIRA, Eurogentec, Bélgica). Os siRNAs foram todos comprados na empresa Ambion e seus códigos de identificação são: siRNA controle – scr catalog: 4611; siRNA anti-*TP53*: ID: 106141 e siRNA anti-*TDG*: ID: s13950;

- troca do meio de cultura RPMI e adição de novo Mix, conforme descrito na etapa anterior e incubação com as amostras por mais 24 horas;

- coleta das células das diferentes amostras, conforme descrito adiante (item 3.4).

OBS: no tratamento para a observação das células por microscopia confocal, lâminas de vidro de formato circular foram depositadas em placas de 12-poços antes do plaqueamento das células para a adesão das mesmas e, após o término do tratamento, as células aderidas foram coletadas e processadas seguindo os passos descritos no item 3.10.

2.3.2. Transfecção do Vetor de Expressão de p53

Os níveis de p53 foram induzidos na linhagem celular TE-13 por transfecção de plasmídeo contendo vetor de expressão de p53 em concentrações crescentes (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 μg), de acordo com o seguinte protocolo:

- cultivo de 3 X 10^5 células TE-13 / 1mL / poço por 24 horas;

- preparação do Mix:

  - 96 μL de meio OptiMEM + 3 μL do reagente transfectante FuGENE® 6 (Roche) deixados à temperatura ambiente por 5 minutos;
  - adição de 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 μg de vetor de expressão de p53 (p53wt-pcDNA3 – sequencia codificante integral da p53 selvagem clonada no vetor pcDNA3) nas amostras teste ou quantidade equivalente de vetor vazio (pcDNA3, Invitrogen – mesmo vetor não contendo a seqüência codificante da p53) (Figura 10) nas amostras controle;
  - temperatura ambiente por 15 minutos;

- distribuição de 100 μL do respectivo Mix para cada amostra e incubação por 24 horas;

- coleta das células das diferentes amostras, conforme descrito adiante (item 3.4).

OBS: no tratamento para a observação das células por microscopia confocal, lâminas de vidro de formato circular foram depositadas em placas de 12-poços antes do plaqueamento das células para a adesão das mesmas e, após o término do tratamento, as células aderidas foram coletadas e processadas seguindo os passos descritos no item 3.10.

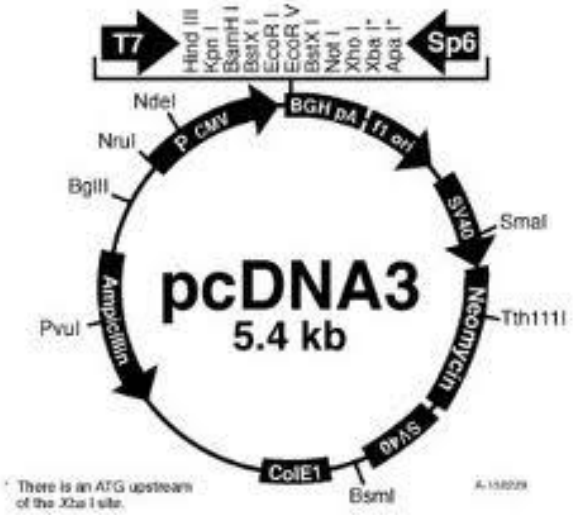


Figura 10: Esquema mostrando constituição do vetor pcDNA3 usado como controle nos experimentos de transfecção do vetor de expressão de p53 (p53wt-pcDNA3) (Invitrogen website)

2.3.3. Tratamento com a Droga Indutora de Dano ao DNA Doxorubicina

O dano ao DNA foi induzido nas linhagens celulares MN1 e MDD2 pelo tratamento com a doxorubicina. Foi feito o tratamento com 500 ng/mL de doxorubicina para a análise de expressão do RNAm e de proteínas dos genes analisados. O protocolo utilizado foi o seguinte:

- 3 X 10^5 células MN1 e MDD2 foram cultivadas por mL em placa de Petri por 24 horas;

- 10 μL de uma solução 500 μg/ mL de doxorubicina (Sigma) preparada com água destilada foram adicionados às placas de Petri contendo as amostras tratadas e 10 μL de água foram adicionados às placas das amostras controle e a incubação ocorreu por 24 horas;

- coleta das células das diferentes amostras, conforme descrito adiante (item 3.4)

2.3.4. Tratamento com o Agente Mutagênico Químico Metil Metanosulfonato (MMS)

Com o objetivo de avaliar a expressão e localização da TDG após dano induzido ao DNA, foi feito o tratamento com concentrações crescentes (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) do agente mutagênico MMS na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37^{o}C e na linhagem NHBE. O protocolo utilizado está descrito a seguir:

- cultivo de 3 X 10^5 (TE-1 32ºC e NHBE) e 2 X 10^5 células (TE-1 37ºC) / mL / poço em placas 6-poços, por 24 horas;

- 2,5; 5,0 e 10 μL de uma solução 100 mM de MMS (Sigma) preparada com água destilada foram adicionados às amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 1,0 mM, respectivamente, e 5 μL de água às amostras controle. A incubação ocorreu por 2 horas.

OBS: no tratamento para a observação das células por microscopia confocal, lâminas de vidro de formato circular foram depositadas em placas de 12-poços antes do

plaqueamento das células para a adesão das mesmas e, após o término do tratamento, as células aderidas foram coletadas e processadas seguindo os passos descritos no item 3.10.

2.4. **Coleta de Células**

As células foram coletadas, de acordo com o seguinte protocolo, para posterior isolamento de RNA e proteínas:

- lavagem das células com 2 mL de tampão PBS 1x (PAA) gelado;

- raspagem das células das placas onde são cultivadas;

- coleta das células raspadas da placa e transferência para um tubo falcon de 15 mL;

- centrifugação das células por 10 minutos à 1300 rpm;

- lavagem do precipitado obtido com PBS 1x gelado e transferência para um tubo eppendorf;

- centrifugação por 10 minutos à 1300 rpm;

- descarte do sobrenadante e armazenamento do precipitado em freezer -80^{o}C para posterior extração de RNA e proteínas;

2.5. **Extração e Quantificação de RNA**

O isolamento do RNA total das amostras foi realizado após a coleta das células utilizando o kit NucleoSpin® RNA II (Protocolo 5.1) e seguindo as instruções do fabricante (Macherey – Nagel, Alemanha).

A concentração de RNA nas amostras foi determinada a partir de uma solução diluída 250 vezes. Um volume de 500 μL de solução foi lido no espectrofotômetro com absorbância determinada no comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da

concentração do RNA tomou por base a informação de que uma unidade de absorbância corresponde a uma concentração de 40 μg/ mL de RNA.

2.6. **Reação de Transcrição Reversa (RT)**

O RNA total extraído das células foi reversamente transcrito em cDNA utilizando a transcriptase reversa SuperScript® (Invitrogen, Cergy Pontoise, França), conforme descrito abaixo:

- adição de 500 ng de primer randômico (Promega, EUA), 1μg de RNA e água destilada autoclavada suficiente para completar o volume final de 20 μL de reação;

- aquecimento da amostra por 5 minutos à 65°C;

- transferência para o gelo por 5 minutos;

- adição de 4 μL do tampão da enzima transcriptase reversa fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Cergy Pontoise, França); 2 μL de DTT 0,1M; 1μL do set de dNTPs a 10mM e 1 μL de SuperScript® contendo 200U;

- incubação por 10 minutos à 25°C;

- incubação por 50 minutos à 42°C;

- inativação da reação por aquecimento à 70°C durante 15 minutos.

2.7. **RT- PCR em Tempo Real**

A análise da expressão do RNAm dos genes investigados foi feita pela técnica de RT-PCR quantitativo. Os níveis de expressão de RNAm da *TDG* e *TP53* foram determinados utilizando o SYBR GREEN e normalizados pela expressão do RNAm do "*housekeeping gene"* GAPDH, usado como controle endógeno.

Para a reação foram utilizados 2 μL de cDNA diluído 5 vezes, aos quais foram acrescidos 10 μL de SYBR GREEN Master Mix 2X (Applied Biosysems), 0,8 μL de primer senso e anti-senso a 10 mM e 6,4 μL de água destilada para completar um volume final de reação de 20 μL. As sequências específicas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados para a amplificação da *TDG*, *TP53* e *GAPDH* utilizando SYBR GREEN estão descritas na tabela abaixo (Quadro 2).

Quadro 2: Seqüências específicas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados na análise da expressão do RNAm da *TDG*, *TP53* e *GAPDH.*

Gene	**Seqüência Senso**	**Seqüência Anti-Senso**
TDG	AAGATGTGCTCAGTTTCCTCG	TAA CAGCCATCTTCTTTGC
TP53	CCTATGGAAACTACTTCCTG	AGGGGAGTACGTGCAAGT
GAPDH	CCGGGAAACTGTGGCGTGATGG	AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT

Todas as reações foram realizadas no termociclador Mx3000P (Stratagene, França), seguindo o programa:

$95^{o}C$ – 15 minutos

35 X { $94^{o}C$ – 15 segundos; $60^{o}C$ – 30 segundos; $72^{o}C$ – 30 segundos

A análise das diferenças na expressão do RNAm dos genes estudados entre as amostras foi feita utilizando o método comparativo do C_T (número de ciclos em que a fluorescência emitida por uma amostra ultrapassa um limiar fixo acima da linha de base), que avalia a diferença de expressão entre as amostras considerando a diferença entre o valor do ΔC_T do gene alvo e do ΔC_T do controle endógeno.

2.8. **Extração e Quantificação de Proteínas Totais**

Após a coleta das células, a extração e quantificação de proteínas foram realizadas, seguindo as etapas descritas abaixo:

- adição de 50 – 200 μL (dependendo da quantidade de células precipitadas) de tampão de lise RIPA-like (TRIS pH 7,4 50 mM; NaCl 250 mM; SDS 0,1%, DTT 2 mM; NP40 0,5% - Merck) contendo coquetel de inibidores de proteases (PMSF 500 mM; leupeptina 0.5 mg/mL; aprotinina 2 g/mL e pepstatina 1mg/mL - Roche);

- incubação no gelo por 30 minutos;

- centrifugação por 15 minutos à 13.000 rpm;

- coleta do sobrenadante contendo proteínas em um tubo eppendorf.

Após a coleta da fração sobrenadante, a determinação da concentração de proteínas foi determinada utilizando o reagente de Bradford, conforme descrito abaixo:

- adição de 1 mL do reagente de Bradford (Bio Rad) diluído 5 vezes a uma cubeta de plástico;

- adição de 1μL da fração contendo proteína da amostra na cubeta junto com o reagente de Bradford;

- leitura da absorbância das amostras determinada no espectrofotômetro a 595 nm de comprimento de onda.

O branco da reação possui apenas o reagente de Bradford diluído. A curva padrão foi feita substituindo-se a fração coletada que contém a proteína da amostra por BSA 0,1% em volumes crescentes de 2, 5, 8, 12 e 15 μL. Todas as amostras, padrões e branco foram feitos em triplicatas.

2.9. ***Western Blotting***

A análise da expressão protéica foi feita utilizando a técnica de *Western blotting.* As amostras foram preparadas numa proporção de 4 volumes de amostra para 1 volume de tampão de amostra (1 mL de SDS 20%; 2 mL de glicerol; 167 μL TRIS 1,5 M, pH 6,8; 600 μL de azul de bromofenol 0,2% e 1 mL de DTT 1M para um volume final de 10 mL ajustados com água destilada), utilizando um volume correspondente a 30 μg de proteínas. As amostras foram centrifugadas brevemente a 1000 rpm e aquecidas à 95^{o}C por 5 minutos e submetidas às seguintes etapas;

- eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% contendo SDS (2,5 mL de solução de acrilamida/biscrilamida 29:1; 2,5 mL de tampão TRIS 1,5M pH 8,8; 100 μL de APS 10%; 10 μL de TEMED; 50 μL de SDS 0,1% e 4,9 mL de água destlida - Merck) a 100 V até a saída do corante. O tampão utilizado consiste em tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3 (Euromedex);

- transferência das amostras do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose (BioRad) a 200 mA por 1 hora, refrigerada por um aparato de gelo na temperatura de -20^{o}C, utilizando tampão de transferência (TRIS 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)) (Euromedex);

- incubação da membrana de nitrocelulose contendo as amostras em solução bloqueadora (solução PBS-BSA 5%) por 1 hora;

- incubação da membrana com anticorpo primário apropriado por 1hora em solução PBS-BSA 2%. O anticorpo policlonal contra TDG (gentilmente cedido pelo Dr. Peter Swann, University College London, Inglaterra) foi utilizado na diluição de 1:7500, o anticorpo monoclonal contra p53 (DO7, Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado na proporção de 1:4000 e o anticorpo contra Ku-80 (Abcam), foi utilizado como *loading control* na diluição de 1:10000;

- lavagem da membrana 6 vezes por 15 minutos com tampão PBS-Tween 0,1%;

- incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho na proporção de 1:8000 - TDG e anti-IgG de camundongo na proporção de 1:10000 – p53 e Ku80) (Dako) em solução PBS-BSA 2%;

- lavagem da membrana 6 vezes por 15 minutos com tampão PBS-Tween 0,1%;
- detecção das proteínas imunoreativas através de kit ECL (Amersham ECl detection kit, Amersham, Inglaterra).

2.10. **Microscopia confocal**

A técnica de microscopia confocal foi utilizada para avaliar a expressão e localização subcelular da TDG e possível co-localização com a p53. Após o tratamento das células e coleta das lâminas de vidro em formato circular, nas quais elas estavam aderidas, foi utilizado o seguinte protocolo:

- posicionamento das lâminas com as células em placas de 12-poços com as células voltadas para cima;

- lavagem das células com PBS;

- fixação das células com uma solução de metanol e acetona (70:30) durante 5 minutos à -20ºC;

- lavagem das células com PBS 6 vezes por 5 minutos;

- permeabilização das células com Triton X-100 0,4% (Roche, Alemanha) 2 vezes por 30 minutos;

- inibição de peroxidades endógenas pela incubação com H_2O_2 5% (Merck) por 30 minutos;

- lavagem com PBS;

- transferência das lâminas para superfície coberta com *parafilm*;

- incubação com solução bloqueadora de ligações inespecíficas TNB (0,5% de substância bloqueadora em tampão TN) (Perkin Elmer) por 60 minutos;

- incubação com anticorpo policlonal da TDG diluição 1:500 preparada em TNB por 1 hora;

- lavagem com tampão TNT 3 vezes por 5 minutos;
-incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Perkin Elmer) conjugado à peroxidase (HRP) na diluição de 1:200 preparada em TNB por 30 minutos;

- lavagem com tampão TNT 3 vezes por 5 minutos;

- amplificação do sinal pela incubação com TSA^{TM} Plus kit (NEL 744, Perkin Elmer) na diluição de 1:100 preparada no diluente de amplificação por 3 minutos;

- lavagem com tampão TNT 3 vezes por 5 minutos;

- incubação com anticorpo monoclonal para p53 (DO-7) na diluição 1:500 preparada em PBS por 1hora;

- lavagem com PBS 3 vezes por 5 minutos;

-incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa-Fluor conjugado a rodamina (Alexa Fluor 568, Invitrogen) por 1 hora;

- lavagem com PBS 3 vezes por 5 minutos;

- incubação com ToPro (Invitrogen) na diluição de 1:300 preparada em PBS por 15 minutos;

- lavagem com tampão PBS 2 vezes por 5 minutos;

- montagem das lâminas utilizando meio para fluorescência Vectashield (Invitrogen);

- análise das lâminas em microscópio, utilizando o software Zeiss LSM Image Examiner (Alemanha).

OBS: Na preparação das lâminas do tratamento das células TE-1 (32ºC e 37ºC) com o agente mutagênico MMS, foi utilizado DAPI (Invitrogen) para a coloração nuclear ao invés de ToPro. Dessa forma, após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas com PBS (3 vezes por 5 minutos) e as lâminas montadas utilizando meio para fluorescência Vectashield contendo DAPI (Invitrogen).

2.11. **Clonagem do promotor do gene *TDG***

A clonagem do promotor do gene *TDG* foi realizada com a finalidade de avaliar a atividade desse gene, através de um sistema repórter, sob diferentes condições experimentais. Os três elementos responsivos ao p53 contidos no promotor do *TDG* foram clonados separadamente no plasmídeo pGL3-básico (Invitrogen), que contém o gene da luciferase, mas não contém promotor, gerando dois sistemas repórter *TDG*-luciferase: um contendo o primeiro elemento responsivo ao p53 (p53RE1) do promotor do *TDG* e o segundo contendo o segundo e terceiro elementos responsivos ao p53 (p53RE2 + p53RE3), de acordo com protocolo descrito abaixo:

- predição da região promotora do gene *TDG* (NCBI, ID: 6996) utilizando o *software* Promotor Scan (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/);

- detecção dos elementos de resposta presente na região promotora pelo uso do *software* MatInspector (http://www.genomatix.de);

- amplificação do cDNA humano do promotor do gene *TDG* contendo o p53RE1 (seqüência primer senso: 5'GGTACCACCAGCACCAGAGCAATG3' e anti-senso: 5'GAGCTCAGTCTTACAGCAGGTGGC3') e o p53RE2 + p53RE3 (seqüência primer senso: 5'GGTACCGGCTGCTCTGAGGGTTAC3' e anti-senso: 5'GAGCTCTGGCTCACATTTGTAATCCT3') pela técnica de PCR;

- clonagem dos fragmentos gerados pela PCR no vetor intermediário pDrive (Figura 11), utilizando o kit para clonagem de produtos de PCR (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante;

- verificação da clonagem e orientação dos fragmentos por sequenciamento;

- digestão dos fragmentos clonados no vetor pDrive, para a liberação dos mesmos, e do vetor pGl3 básico (Figura 11), para sua abertura, catalisada pelas enzimas KpnI e SacI (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante;

- ligação dos fragmentos liberados do vetor pDrive com o vetor pGl3 básico aberto catalisada pela enzima T4 DNA ligase (USB), de acordo com as instruções do fabricante;

- transformação do plasmídeo produto da ligação em bactérias competentes DH5α *E. coli* (Bethesda Research Laboratories), nas seguintes etapas:

- adição de 3 μL do plasmídeo produto da ligação em 100 μL de bactérias competentes DH5α *E. coli* descongeladas no gelo;
- incubação da mistura no gelo por 30 minutos;
- incubação da mistura à 42ºC por 1 minuto;
- incubação da mistura no gelo por 2 minutos;
- adição de 250 μL de meio para crescimento de bactérias LB (Luria-Bertani broth);
- incubação da mistura à 37ºC por 60 minutos sob 300 rpm de agitação;
- plaqueamento de 300 μL da mistura em placas preparadas com LB Agar e ampicilina na concentração de 100 μg / μL;
- incubação à 37ºC, *overnight*.

- coleta das colônias formadas e cultivo das mesmas em meio LB à 37ºC, *overnight*, sob agitação;

- extração do DNA plasmidial utilizando kit para preparação de DNA plasmidial (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante;

- verificação da clonagem e orientação dos fragmentos por sequenciamento.

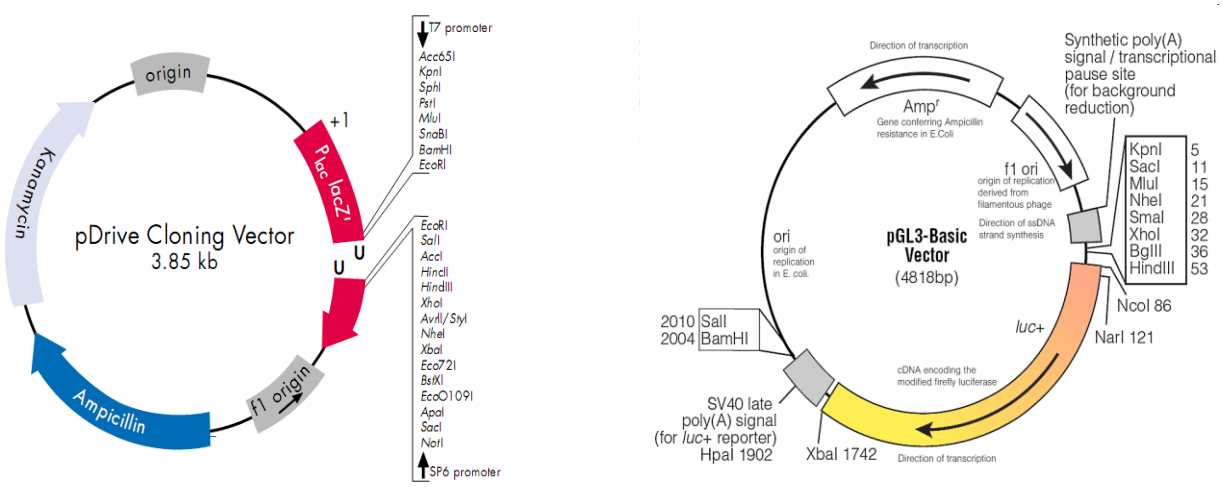


Figura 11: Esquema mostrando constituição dos vetores utilizados na clonagem do promotor do gene *TDG* pDrive e pGL3 basic (Invitrogen website e Qiagen website)

2.12. **Mutagênese sítio-dirigida**

Após a clonagem do promotor do gene TDG, a técnica de mutagênese sítio-dirigida foi utilizada para excluir os elementos responsivos ao p53 e avaliar a atividade do plasmídeo repórter *TDG*-luciferase gerado, sob diferentes condições experimentais. O sistema repórter utilizado foi o que continha os elementos responsivos 2 e 3 (p53RE2 + p53RE3) e 3 novos plasmídeos foram gerados: um no qual o p53RE2 foi excluído, um no qual o p53RE3 foi excluído e um último no qual ambos p53RE2 e p53RE3 foram excluídos. O protocolo seguido foi:

- amplificação de 30 ng de plasmídeo repórter *TDG*-luciferase utlizando 125 ng dos primers mutagênicos contendo as deleções, 1 μL da enzima Pfu DNA polimerase (Invitrogen), 0,8μL do set de dNTPs (25 mM), 1 μL de DMSO e água MiliQ suficiente para completar o volume final de 50 μL. As seqüências dos primers utilizados para a deleção do p53RE2 foram: senso 5'GGCCTGTTCATGTCTGTAAAGTAGAATTGGTGTTACATGAAAGG3' e anti-senso 5'CCTTTCATGTAACACCAATTCTACTTTACAGACATGAACAGGCC3' e para o p53RE3: senso 5'GTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTTCCACCTGCCTCGGC3' e anti-senso 5'GCCGAGGCAGGTGGAAAACCCTGTCTCTACTAAAAATAC3'. A seqüência que teve o p53RE2 deletado serviu como molde para a deleção do p53RE3 e produção do plasmídeo contento ambos p53RE2 e p53RE3 deletados. O programa para a amplificação:

94ºC – 5 min
18 X { 94ºC – 1 min; 58ºC – 1 min; 68ºC – 7 min }
68ºC – 16 min

- digestão dos plasmídeos amplificados com DpnI (Invitrogen) à 37ºC por 60 minutos;

- verificação da digestão em gel de agarose 1%;

- transformação do plasmídeo produto da ligação em bactérias competentes DH5α *E. coli* (Bethesda Research Laboratories), nas seguintes etapas:

- adição de 3 μL do plasmídeo produto da ligação em 100 μL de bactérias

competentes DH5α *E. coli* descongeladas no gelo;

- incubação da mistura no gelo por 30 minutos;
- incubação da mistura à 42ºC por 1 minuto;
- incubação da mistura no gelo por 2 minutos;
- adição de 250 μL de meio para crescimento de bactérias LB (Luria-Bertani broth);
- incubação da mistura à 37ºC por 2 minutos sob 300 rpm de agitação;
- plaqueamento de 300 μL da mistura em placas preparadas com LB Agar e ampicilina na concentração de 100 μg / μL;
- incubação à 37ºC, *overnight*.

- coleta das colônias formadas e cultivo das mesmas em meio LB à 37ºC, *overnight*, sob agitação;

- extração do DNA plasmidial utilizando kit para preparação de DNA plasmidial (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante;

- verificação da mutagênese sítio-dirigida por sequenciamento.

2.13. **Ensaio Duplo da Luciferase**

A atividade produzida pelos plasmídeos foi medida por um sistema duplo utilizando a luciferase como repórter (Dual Luciferase Reporter Assay System kit, Promega). 1 μg dos plasmídeos repórteres *TDG*-luciferase foram transfectados nas células utilizando Fugene como agente transfectante e o vetor pGL3 básico como controle negativo dos experimentos. Os níveis de atividade firefly luciferase produzidos pelos sistemas-repórteres foram normalizados pelos níveis do vetor controle pRL-TK, que codifica a atividade de *Renilla* luciferase, também transfectado nas células e foram medidos 48 horas após a transfecção utlizando um TD20/20 luminometro (Optocompl®, MGM Instruments). Os experimentos seguiram o protocolo sugerido pelo fabricante (Promega).

2.14. **Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP ASSAY)**

O ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP assay) foi realizado com o objetivo de avaliar a ligação da p53 ao promotor do *TDG*. O experimento foi realizado utilizando o seguinte protocolo:

- plaqueamento de 2 X 10^6 células TE-13 em uma placa de Petri;

- adição de 1% formaldeído ao meio de cultura por 10 minutos, 24 horas após o plaqueamento das células;

- adição de 125 mM de glicina por 5 minutos;

- lavagem das células com PBS gelado contendo inibidores de proteases (Complete, Mini; Protease Inhibitors Cocktail Tablets Complet, Roche);

- raspagem das células em PBS gelado contendo inibidores de proteases;

- centrifugação das células à 1500 rpm durante 5 minutos;

- ressuspensão do precipitado de células em 250 μL de tampão de lise celular- SDS contendo inibidores de proteases;

- incubação no gelo por 15 minutos;

- sonicação das células ressuspensas em tampão de lise celular-SDS, utilizando o aparelho Vibra cell 75041 e as seguintes condições: 12 X (5' on: 5s off), intervalo de 30 segundos e repetição das mesmas condições, amplitude 21%;

Após a sonicação das células, seguiu-se a etapa de imunoprecipitação de proteínas utilizando 4 μg de anticorpo anti-p53 (CM1, Novo Castra) e bilhas magnéticas provenientes do ChIP-Adem-kit (Ademtech), de acordo com o protocolo do fabricante. O *cross-link* DNA-p53 foi revertido pela adição de 200 mM de NaCl à 65ºC por 4 horas. O DNA foi tratado com 10 mg/mL de Proteinase K à 45ºC por 1 hora e recuperado pela extração com fenol/clorofórmio. Para a amplificação do promotor do *TDG* as seguintes seqüências de primers foram utilizadas: senso 5'CTGGTTCAAGCGATTCTCC3' e anti-senso 5'GCTCCATTCATAACCTCAAGA3'. O promotor *WAF1/p21* foi também amplificado utilizando como seqüência de primer

senso 5'CATTGTTCCCAGCACTTCCTC3' e anti-senso 5'AGAAAGCCAATCAGAGCCACAG3'. O DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose 2%.

2.15. **Ensaio de proliferação WST-1**

As células TE-1 tiveram sua proliferação observada após tratamento com o agente mutagênico MMS. As células TE-1 foram plaqueadas em placas 96-poços (10^4 células/ poço) 24 horas antes do tratamento com MMS. A proliferação celular foi avaliada pelo reagente de proliferação celular WST-1, num ensaio colorimétrico (Roche), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância final obtida foi medida a 450 nm usando um leitor de microplacas (MRX Revelation, DYNEX Technologies).

2.16. **Citometria de fluxo**

O ciclo celular e a síntese de DNA das células TE-1 foram analisados após silenciamento do gene TDG e tratamento com MMS, pela técnica de citometria de fluxo através da marcação com BrdU e iodeto de propídeo (PI), de acordo com o protocolo a seguir:

- adição de 2 μg de BrdU (BD-Pharmigen) a 2 mL de meio de cultura, após o término do período de tratamento das células, por 2 horas;

- remoção do sobrenadante;

- adição de 350 μL de acutase (Sigma) às células e incubação por 5 minutos à 37ºC;

- adição de 350 μL de PBS e coleta das células;

- centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos;

- remoção do sobrenadante;

- adição de 100 μL de etanol 70% ao precipitado de células;

- incubação das células em etanol a 4ºC por, no mínimo, 30 minutos;
- ressuspensão das células em 100 μL PBS;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 100 μL de HCL 3N por 20 minutos;

- adição de 10 μL de PBS;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 100 μL de PBS;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 100 μL de Borax (borato de sódio: $Na_2B_4O_7$ 0,1M, pH 8,5) por 3 minutos;

- ressuspensão do precipitado de células em 100 μL de PBS/ FBS 2,5%;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 100 μL de PBS/ FBS 2,5%;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 10 μL de anticorpo anti-BrdU (BD-Pharmigem) por 20 minutos no escuro;

- adição de 100 μL de PBS/ FBS 2,5%;

- centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos e remoção do sobrenadante;

- ressuspensão do precipitado de células em 300 μL de PBS/ FBS 2,5%;

- adição de 30 μg de iodeto de propídeo (PI) (Sigma);

- análise do ciclo celular e síntese de DNA utilizando o equipamento BD FACSCanto e o software BD FACSDiva 6.

2.17. **Análises estatísticas**

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Incorporated, São Diego, CA, EUA). Foram utilizados o teste *t*-Student não pareado e o teste exato de Fisher para determinar diferenças na análise das amostras, as quais foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3 **RESULTADOS**

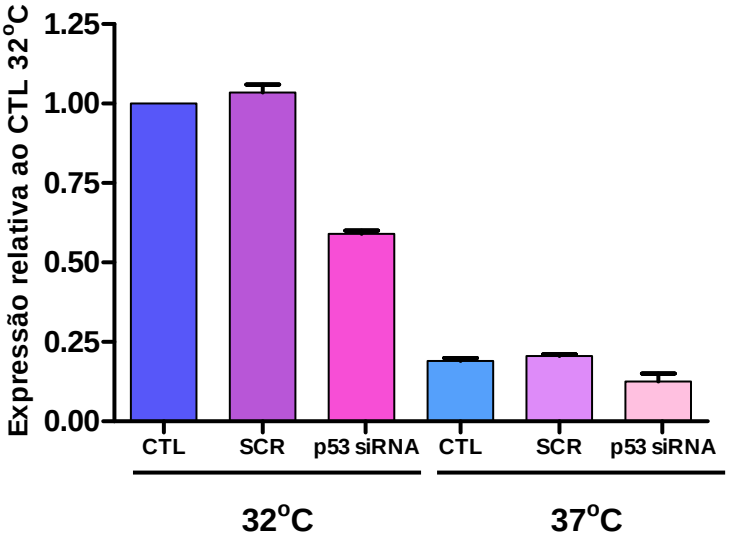
3.1 **Regulação da expressão de TDG pela p53 Selvagem ou Mutada**

A expressão do RNAm e da proteína da *TDG* foi observada em diferentes sistemas celulares competentes ou deficientes para p53*,* sob o efeito de diversos tratamentos, conforme descrito a seguir:

3.1.1. Efeito do silenciamento de *TP53* e da proteína p53 mutada sobre a expressão do RNAm e de proteína da *TDG* na linhagem celular TE-1

A primeira linhagem celular utilizada foi a TE-1, que apresenta uma mutação termo-sensível em *TP53*, resultando na maior parte da proteína na forma "mutante" inativa quando cultivada à 37^{o}C e na proteína "selvagem" ativa quando mantidas à 32^{o}C. Além deste sistema, avaliamos o efeito da inibição da expressão gênica do *TP53* pelo uso de RNA de interferência para *TP53* (p53 siRNA) na linhagem TE-1.

Na Figura 12 e Tabela 1 está representada a expressão do RNAm da *TDG* nas amostras não tratadas com siRNA (CTL), nas tratadas com siRNA controle (SCR) e nas tratadas com siRNA para p53 (p53 siRNA) das culturas mantidas à 37 e 32^{o}C. Os valores são relativos à expressão na amostra não tratada da cultura mantida à 32^{o}C (CTL 32^{o}C). Conforme esperado, as amostras SCR cultivadas à 37 e 32^{o}C não apresentaram variações significativas em relação às suas respectivas amostras CTL na expressão do RNAm da *TDG*. Houve uma diminuição significativa de 80% na expressão da amostra CTL 37^{o}C e de 45% na p53 siRNA 32^{o}C, quando comparada a CTL 32^{o}C. A amostra p53 siRNA sofreu um decréscimo não significativo de 34% na expressão do RNAm quando comparado com a amostra CTL à 37^{o}C.



32°C			37°C		
CTL	SCR	p53 siRNA	CTL	SCR	p53 siRNA
1	1,03 ± 0,035	0,55 ± 0,07	0,19 ± 0,014	0,206 ± 0,007	0,12 ± 0,035

Figura 12 e Tabela 1: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37°C. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle cultivada à 32°C (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre SCR 32°C, p53 siRNA 32°C ou CTL 37°C em relação ao CTL 32°C. (Teste *t*-Student não pareado)

O anticorpo policlonal anti-TDG utilizado detectou a TDG na forma de uma banda dupla de peso molecular em torno de 75-80kDa. A TDG purificada é uma proteína de aproximadamente 60 kDa (UM, S.*et al*., 1998). Como a interação entre a TDG e as proteínas SUMO já foi bem descrita (MINTY, A. *et al*., 2000; HARDELAND, U. *et al*., 2002; STEINACHER, R. e SCHÄR, P., 2005), foi testado um anticorpo anti-SUMO e houve a detecção de um sinal entre 75-80 kDa compatível com o sinal detectado pelo anticorpo anti-TDG, sugerindo que nessas células a TDG é detectada principalmente na forma SUMOilada (Figura13). A expressão protéica da TDG seguiu o mesmo perfil de variação observado na expressão de seu RNAm, com uma diminuição da expressão observada na amostra transfectada com p53 siRNA e cultivada à 32ºC, quando comparada à amostra controle ou transfectada com siRNA controle, e também nas amostras CTL cultivadas a 37°C, quando comparadas às cultivadas à 32°C (Figura 14).

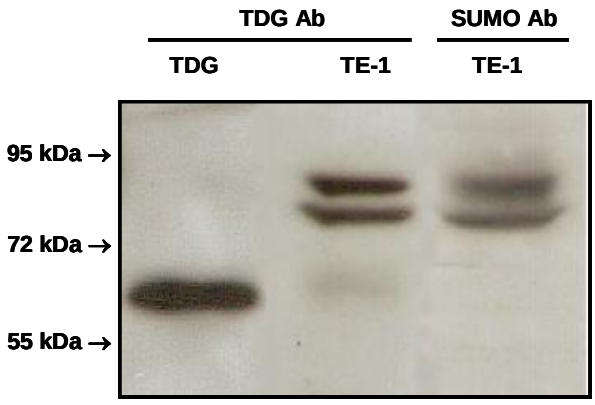


Figura 13: Western blotting da proteína TDG purificada e do extrato de células TE-1 utilizando anticorpo anti-TDG e anti-SUMO.

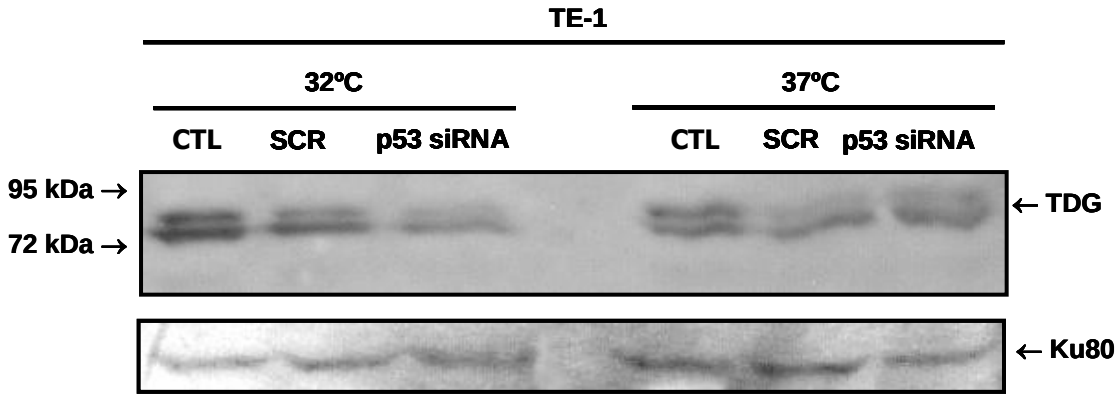
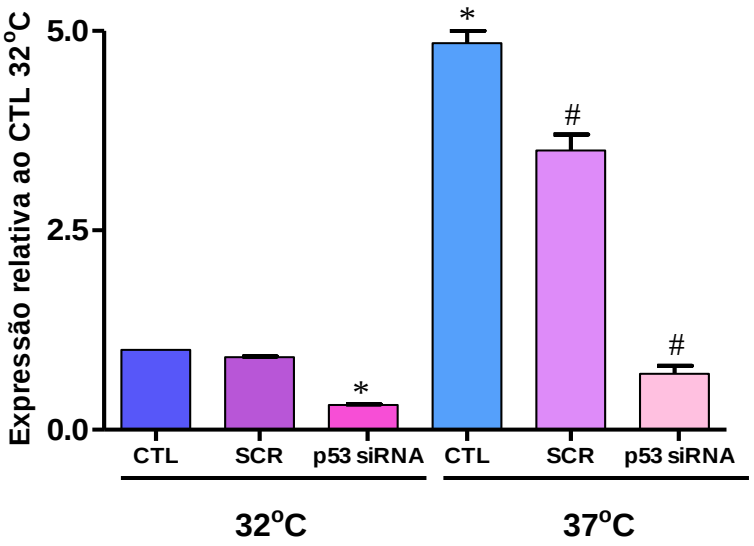


Figura 14: Expressão protéica da TDG nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37°C

A expressão do RNAm do *TP53* está representada na Figura 15 e Tabela 2. Os valores apresentados são referentes à expressão detectada na amostra CTL 32°C. Em comparação à amostra CTL 32°C, houve uma diminuição significativa de 9 e 69%, respectivamente em SCR e p53 siRNA, mantidas à mesma temperatura. De forma contrária, um aumento significativo de 4,8 vezes foi observado na amostra CTL 37°C em relação à expressão em CTL 32°C. Na expressão do RNAm do *TP53* dentre as amostras mantidas à 37°C, houve um decréscimo significativo de 28% na expressão da amostra SCR e de 85% na amostra p53 siRNA, quando comparado à expressão obtida na amostra CTL 37°C.



32°C			37°C		
CTL	SCR	p53 siRNA	CTL	SCR	p53 siRNA
1	0,91 ± 0,014	0,31 ± 0,014	4,85 ± 0,21	3,5 ± 0,28	0,70 ± 0,14

Figura 15 e Tabela 2: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37°C. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle cultivada à 32°C (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre SCR 32°C, p53 siRNA 32°C ou CTL 37°C em relação ao CTL 32°C. # Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre SCR 37°C e p53 siRNA 37°C em relação ao CTL 37°C. (Teste *t*-Student não pareado)

A expressão de p53 avaliada por *Western blotting*, mostrou maiores níveis de expressão nas células TE-1 mantidas à 32ºC do que a 37ºC e não apresentou diferenças de expressão significativas entre as amostras controle e as amostradas transfectadas com siRNA controle. Conforme esperado, as amostras transfectadas com siRNA p53 tiveram seus níveis de expressão significativamente reduzidos tanto à 32ºC quanto à 37ºC (Figura 16).

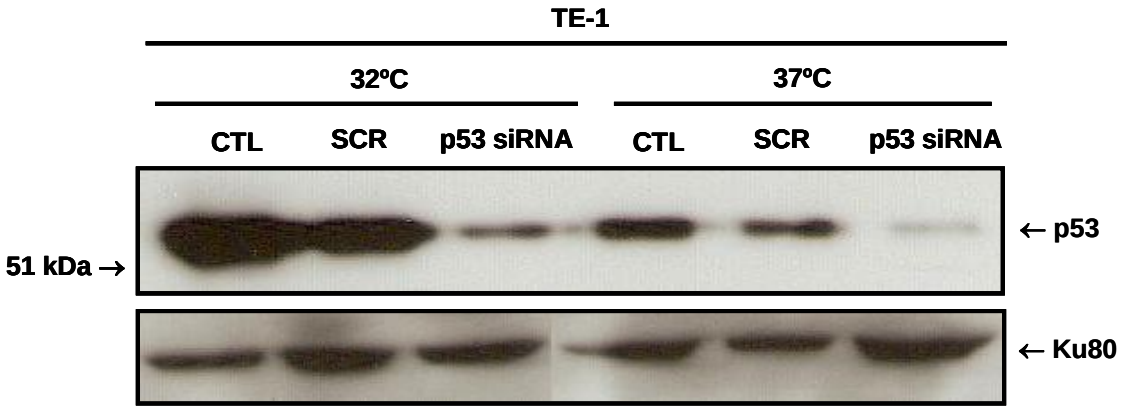


Figura 16: Expressão protéica da p53 nas amostras controle (CTL), tratadas com siRNA controle (SCR) e com siRNA para p53 (p53 siRNA) na linhagem celular TE-1 cultivada à 32 e 37°C.

A expressão e localização subcelular da TDG e p53 foram avaliadas pela técnica de Microscopia Confocal e demonstraram o mesmo padrão de variação antes observado na expressão do RNAm e da proteína por *Western blotting*: significante repressão da expressão de TDG após transfecção com siRNA p53 nas células mantidas à 32ºC, mas não nas células mantidas à 37ºC. A TDG foi localizada no citoplasma das células. O sinal fluorescente relativo à TDG foi confirmado como específico, uma vez que as células TE-1 foram transfectadas com siRNA para TDG e esse sinal foi abolido, em ambas as temperaturas, após a transfecção com siRNA TDG (Figura 17).

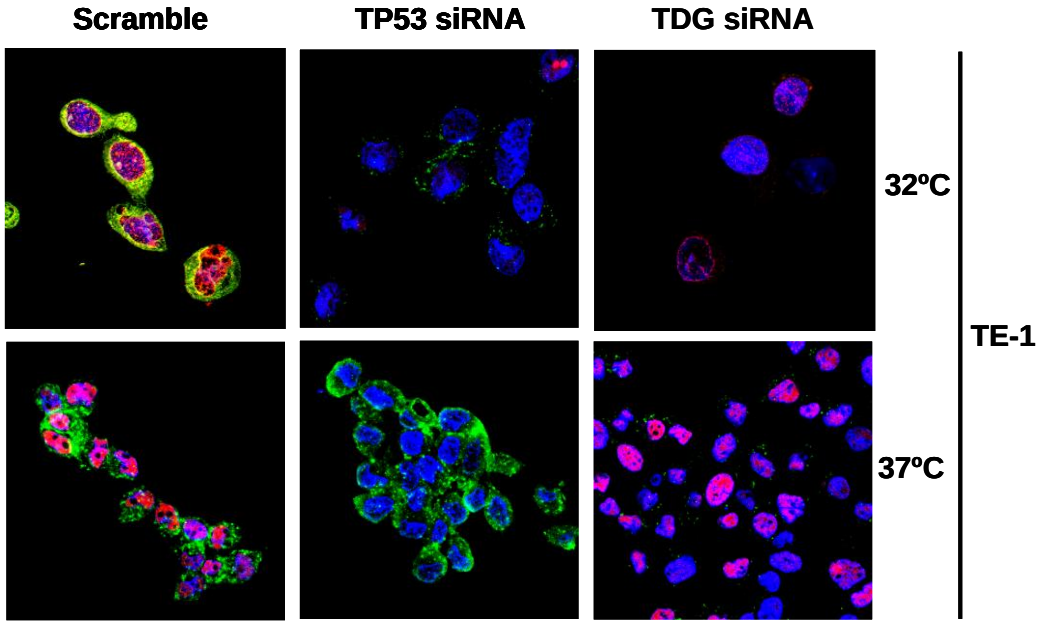
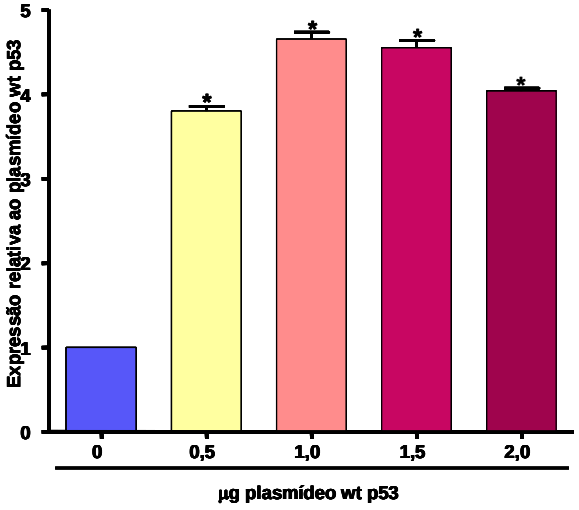


Figura 17: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-1 após transfecção com siRNA p53 ou siRNA TDG. O sinal fluorescente verde representa a TDG, o sinal fluorescente vermelho representa a p53 e o sinal fluorescente azul representa o núcleo celular.

3.1.2. Efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão do RNAm e da proteína *TDG* na linhagem celular TE-13

A linhagem celular TE-13, que apresenta quantidades muito baixas de RNAm e não apresenta expressão da p53, foi utilizada para confirmar a dependência de p53 na expressão da TDG. O aumento dos níveis de p53 nessas células foi induzido por transfecção em quantidades crescentes de vetor de expressão de p53. Na Figura 18 e Tabela 3 está representada a expressão do RNAm da *TDG* nas amostras transfectadas com vetor vazio (0) e nas amostras transfectadas com 0,5 μg (0,5); 1,0 μg (1,0); 1,5 μg (1,5) e 2,0 μg (2,0) de vetor de expressão de p53. Os valores representados são relativos à expressão do RNAm detectada na amostra transfectada com vetor vazio (0). Foi observado um aumento significativo na expressão do RNAm da *TDG* de 3,80; 4,65; 4,55 e 4,0 vezes nas amostras transfectadas com 0,5; 1,0; 1,5 μg e 2,0 μg de vetor de expressão de p53, respectivamente. A expressão protéica da TDG está ilustrada na Figura 19 e mostra um aumento crescente na intensidade da banda imunoreativa conforme ocorre o aumento da quantidade de vetor de expressão de p53 transfectado. De forma semelhante ao observado nas células TE-1, a banda detectada por *Western blotting* nas células TE-13 corresponde à forma SUMOilada da TDG.



µg plasmídeo *wt* p53				
0	0,5	1,0	1,5	2,0
1	3,8 ± 0,14	4,65 ± 0,21	4,55 ± 0,21	4,05 ± 0,10

Figura 18 e Tabela 3: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na amostra transfectada com vetor vazio (0) e nas amostras transfectadas com 0,5 µg (0,5); 1,0 µg (1,0); 1,5 µg (1,5) e 2,0 µg (2,0) de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra transfectada com vetor vazio (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,5; 1,0 ou 1,5 µg de vetor de expressão de p53 em relação à amostra transfectada com vetor vazio (0). # Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostra transfectada com 1,0 µg em relação à amostra transfectada com 0,5 µg de vetor de expressão de p53. (Teste *t*-Student não pareado)

A expressão protéica da TDG também foi avaliada pela técnica de Microscopia Confocal após a transfecção de 0,5; 1,0 e 1,5 µg de vetor de expressão de p53 (Figura 20). Não foi detectada expressão de TDG nas amostras transfectadas com vetor vazio (0) e o sinal fluorescente da TDG aumentou de intensidade conforme o aumento da quantidade de vetor transfectado, de acordo com os resultados obtidos na expressão do RNAm e proteína (por *Western Blotting*).

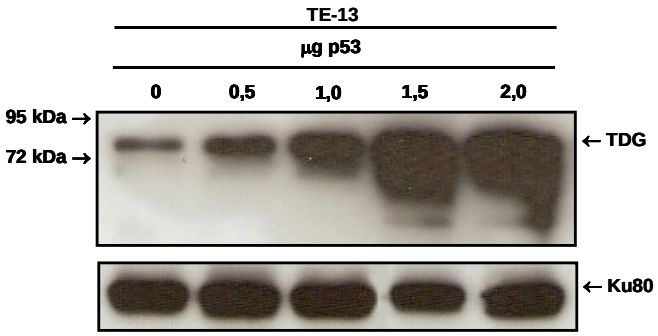


Figura 19: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG na amostra transfectada com vetor vazio (0) e nas amostras transfectadas com 0,5 µg; 1,0 µg; 1,5 µg e 2,0µg de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13.

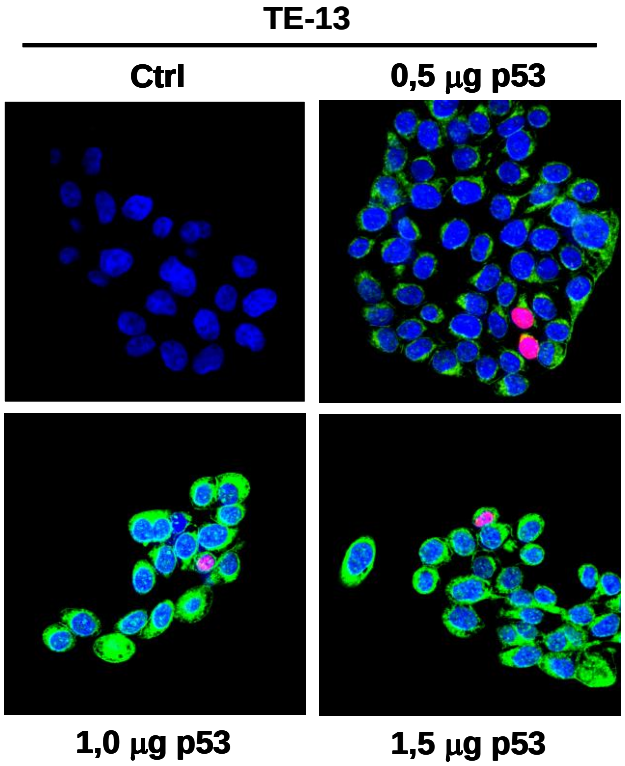
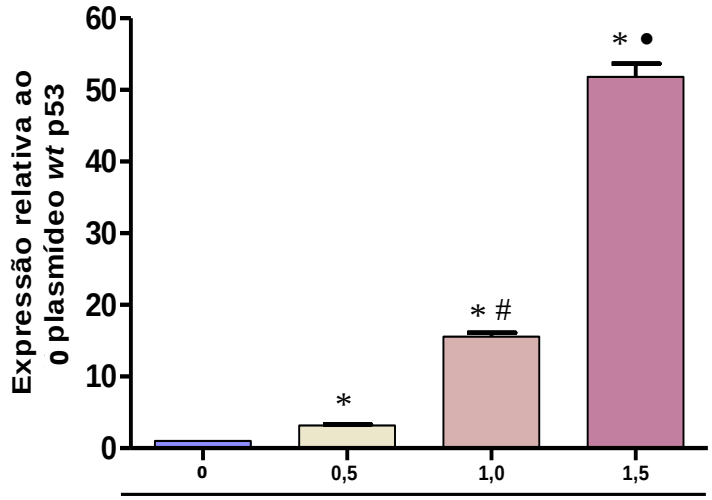


Figura 20: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-13 após transfecção do vetor de expressão de p53. O sinal fluorescente verde representa a TDG, o sinal fluorescente vermelho representa a p53 e o sinal fluorescente azul representa o núcleo celular.

A Figura 21 e Tabela 4 representam a análise da expressão do RNAm do *TP53*, com valores relativos aos detectados na amostra controle (transfectada com vetor vazio). Foi detectado um aumento significativo de 3,15; 15,55 e 50,15 vezes na expressão do RNAm do *TP53*, respectivamente, nas amostras transfectadas com 0,5; 1,0 e 1,5 μg de vetor de expressão de p53. A análise da expressão protéica por *Western blotting* (Figura 22) mostra que não foi detectada a banda de 53 kDa referente à p53 na amostra transfectada com vetor vazio (0), entretanto, nas amostras transfectadas com 0,5; 1,0 e 1,5 μg do vetor expressão, a p53 foi detectada e sofreu um aumento proporcional à quantidade de vetor transfectado.



µg plasmídeo *wt* p53			
0	0,5	1,0	1,5
1	3,15 ± 0,21	15,55 ± 0,77	50,15 ± 2,6

Figura 21 e Tabela 4: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* na amostra transfectada com vetor vazio (0) e nas amostras transfectadas com 0,5 µg (0,5); 1,0 µg (1,0) e 1,5 µg (1,5) de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13. os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra transfectada com vetor vazio (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,5; 1,0 ou 1,5 µg de vetor de expressão de p53 em relação à amostra transfectada com vetor vazio (0). # Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostra transfectada com 1,0 µg em relação à amostra transfectada com 0,5 µg de vetor de expressão de p53. • Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostra transfectada com 1,5 µg em relação à amostra transfectada com 1,0 µg de vetor de expressão de p53. (Teste *t*-Student não pareado)

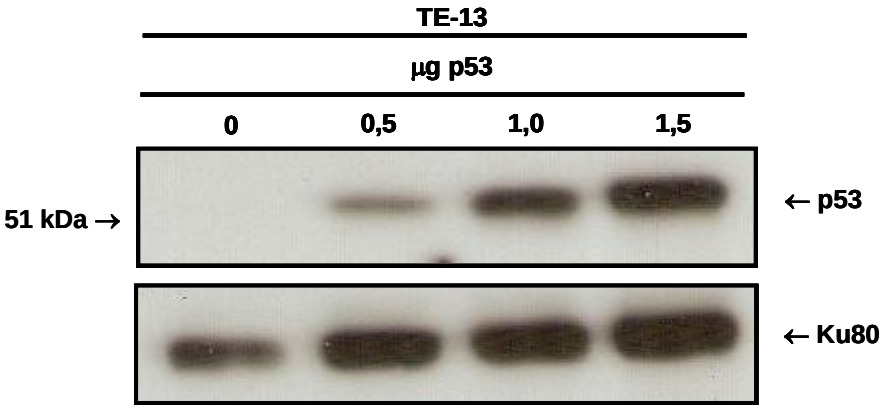
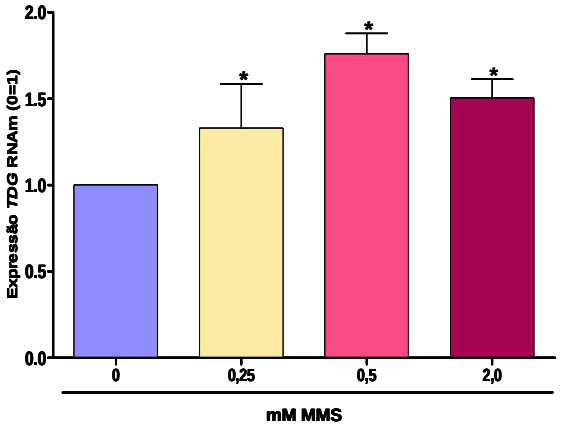


Figura 22: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica do p53 na amostra transfectada com vetor vazio (0) e nas amostras transfectadas com 0,5 µg; 1,0 µg e 1,5 µg de vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13.

3.1.3. Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm da *TDG* e da proteína na linhagem celular TE-1

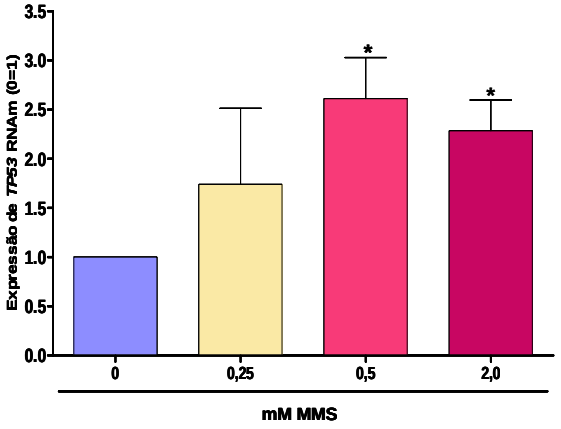
Com o objetivo de avaliar o efeito da indução de dano ao DNA, e consequente aumento nos níveis de p53 sobre a expressão de *TDG*, células TE-1, cultivadas à 32ºC ou 37ºC, foram tratadas com diferentes doses do agente mutagênico causador de dano ao DNA, MMS (metil metanosulfonato), e seus níveis de RNAm e proteína foram avaliados por RT – PCR quantitativo e *Western blotting*, respectivamente. Além disto, a localização subcelular da TDG e p53, e seus níveis de expressão, foram também analisados pela técnica de Microscopia Confocal. A expressão do RNAm do *TP53* também foi avaliada.

Na Figura 23 e Tabela 5 está representada a expressão do RNAm da *TDG* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC. Os valores representados são relativos à expressão do RNAm detectado na amostra controle (0). Foi observado um aumento significativo na expressão do RNAm da *TDG* de 1,33; 1,76 e 1,5 vezes nas amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS, quando comparada à expressão na amostra controle (0). A expressão do RNAm de *TP53* mostrou um padrão de variação semelhante ao observado na expressão do RNAm de *TDG*, com um aumento de 1,7; 2,6 e 2,3 vezes, respectivamente, para as amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS quando comparada à expressão na amostra controle (Figura 24 e Tabela 6).



mM MMS			
0	0,25	0,5	2,0
1	1,33 ± 0,3	1,76 ± 0,13	1,5 ± 0,12

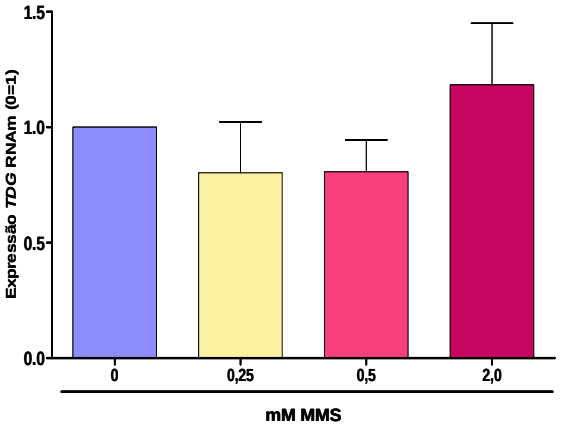
Figura 23 e Tabela 5: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 2,0 mM (2,0) de MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,25; 0,5 ou 2,0 mM de MMS em relação à amostra controle (0). (Teste *t*-Student não pareado)



mM MMS			
0	0,25	0,5	2,0
1	1,7 ± 0,75	2,6 ± 0,6	2,3 ± 0,35

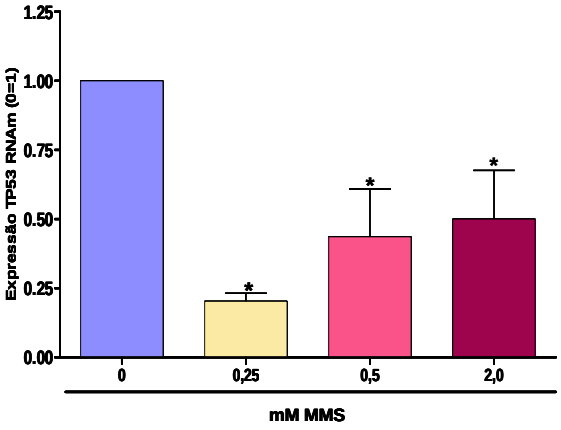
Figura 24 e Tabela 6: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 2,0 mM (2,0) de MMS de células TE-1 cultivadas à 32ºC. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,25; 0,5 ou 2,0 mM de MMS em relação à amostra controle (0). (Teste *t*-Student não pareado)

O mesmo tratamento foi realizado em células TE-1 mantidas à 37ºC, porém, não houve diferenças significativas na expressão do RNAm de *TDG* nas amostras tratadas com MMS (0,25; 0,5 e 2,0 mM) quando comparada à expressão detectada na amostra controle (0) (Figura 25 e Tabela 7). A expressão de RNAm de *TP53* sofreu uma diminuição significativa de 80; 57 e 50% nas amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS, respectivamente, quando comparada à amostra controle (0) (Figura 26 e Tabela 8).



mM MMS			
0	0,25	0,5	2,0
1	0,8 ± 0,75	0,81 ± 0,12	1,2 ± 0,30

Figura 25 e Tabela 7: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 2,0 mM (2,0) de MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). (Teste *t*-Student não pareado)



mM MMS			
0	0,25	0,5	2,0
1	0,2 ± 0,08	0,43 ± 0,2	0,5 ± 0,18

Figura 26 e Tabela 8: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 2,0 mM (2,0) de MMS de células TE-1 cultivadas à 37ºC. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,25; 0,5 ou 2,0 mM de MMS em relação à amostra controle (0). (Teste *t*-Student não pareado

Um efeito paralelo foi observado na expressão protéica da TDG. Nas células TE-1 tratadas com diferentes doses de MMS e mantidas à 32ºC, houve um aumento na expressão de TDG que acompanhou o aumento na dose de MMS utilizada. Entretanto, nas células TE-1 mantidas à 37ºC, não ocorreram mudanças significativas nos níveis de expressão da TDG após o tratamento com diferentes doses de MMS (Figura 27). A diminuição nos níveis de expressão da TDG observados em ambas as temperaturas nas amostras tratadas com 2,0 mM MMS é provavelmente causada pelo efeito tóxico do agente mutagênico nesta dose.

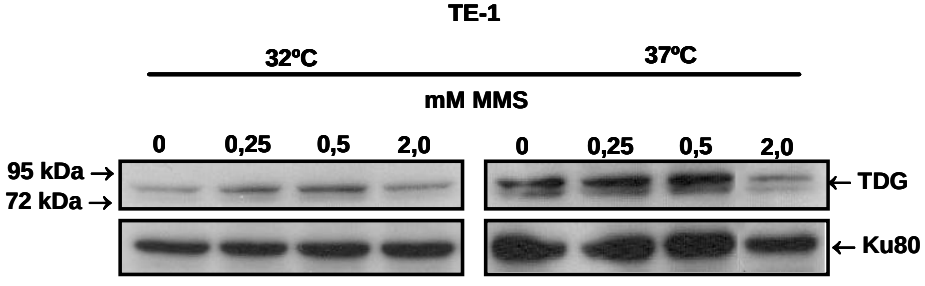


Figura 27: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG nas amostras controle (0) e tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS na linhagem celular TE-1 mantida à 32ºC ou 37ºC.

A expressão protéica da TDG e sua localização subcelular foram avaliadas pela técnica de Microscopia Confocal após o tratamento das células TE-1 (32ºC e 37ºC) com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS. Conforme os resultados de expressão protéica obtidos pela técnica de *Western blotting*, as imagens geradas pela Microscopia Confocal demonstraram um aumento da expressão da TDG ao longo do tratamento com doses crescentes de MMS nas células TE-1 cultivas à 32ºC, mas não nas células cultivadas à 37ºC. Além disso, a proteína TDG que inicialmente foi localizada no citoplasma das células controle (Ctrl) sofreu uma translocação nuclear após o tratamento com MMS nas células p53 competentes (32ºC), mas esse fenômeno não foi observado nas células p53 deficientes (37ºC) (Figura 28).

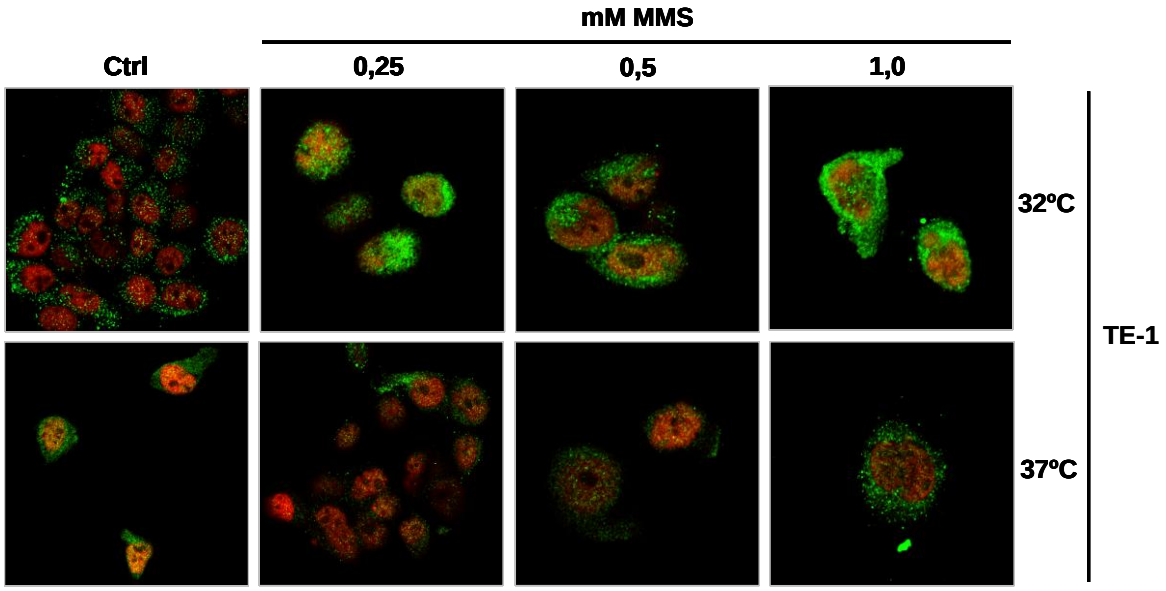
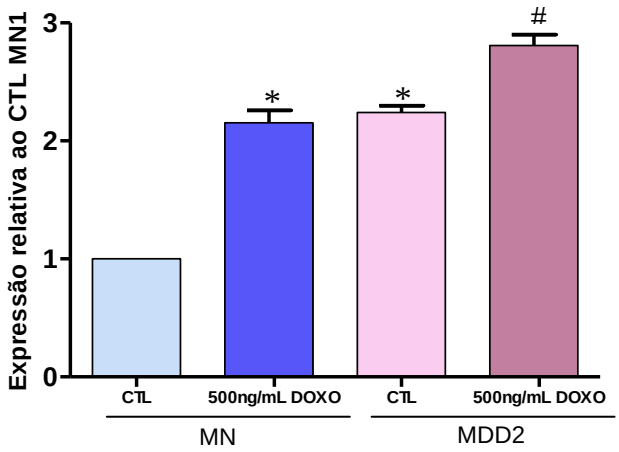


Figura 28: Expressão e localização subcelular da TDG e p53 em células TE-1 mantidas à 32ºC ou 37ºC após o tratamento com doses crescentes do agente mutagênico MMS. O sinal fluorescente verde representa a TDG, o sinal fluorescente vermelho representa a p53.

3.1.4. Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm e proteína de *TDG* nas linhagens celulares MN1 e MDD2

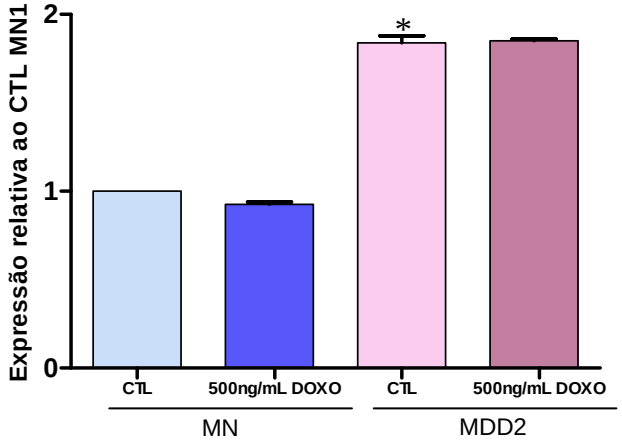
Avaliamos o efeito dos níveis de p53 sobre a expressão de *TDG* em linhagens de outros tumores que não sejam de esôfagos, a fim de excluirmos qualquer possibilidade dos resultados obtidos serem ligados às linhagens de tumores de esôfago utilizadas. Assim, utilizamos as linhagens celulares isogênicas MN1 e MDD2, derivadas da linhagem de câncer de mama MCF-7. A MDD2 expressa um peptídeo inibitório que bloqueia a oligomerização da p53 e a MN1 é transfectada com o mesmo peptídeo sem a seqüência codificante. Para analisar o efeito da indução de dano ao DNA, e conseqüente indução dos níveis de p53, sobre a expressão do RNAm da *TDG* e da proteína, as linhagens celulares MN1 e MDD2 foram tratadas com a droga indutora de dano ao DNA, doxorubicina. Na Figura 29 e Tabela 9 está representada a expressão do RNAm da *TDG* nas amostras não tratadas (CTL) e nas amostras tratadas com 500 ng/mL de doxorubicina, tanto na linhagem celular MDD2 quanto na sua linhagem "controle", MN1, com valores relativos à expressão detectada na amostra não tratada (CTL) MN1. Houve um aumento significativo de 2,15 vezes nas amostras MN1 tratadas com 500 ng/mL de doxorubicina e de 2,4 vezes na amostra MDD2 CTL, quando comparadas à expressão na amostra CTL MN1. Observamos também um aumento significativo de 1,25 vezes na amostra MDD2 tratada com 500 ng/mL de doxorubicina em relação à expressão do RNAm da *TDG* detectada na amostra CTL MDD2.

A expressão do RNAm do *TP53* nas amostras de células MN1 e MDD2, tratadas ou não com doxorubicina, está representada na Figura 30 e Tabela 10, com valores relativos à expressão detectada na amostra CTL MN1. A amostra MN1 tratada com 500 ng/mL de doxorubicina não apresentou diferenças significativas na expressão do RNAm do *TP53*, em comparação com a expressão detectada na amostra CTL MN1, enquanto que um aumento significativo de 1,84 vezes foi observado na amostra CTL MDD2. A amostra MDD2 tratada com doxorubicina também não apresentou variação na expressão do RNAm quando comparada com sua amostra controle (CTL MDD2).



MN1		MDD2	
CTL	500	CTL	500
1	2,15 ± 0,15	2,24 ± 0,08	2,81 ± 0,13

Figura 29 e Tabela 9: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras não tratadas (CTL) e tratadas com 500 ng/mL de doxurubicina nas linhagens celular MN1 e MDD2. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra não tratada da cultura MN1 (CTL MN1) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras MN1 tratada com 500 ng/mL de doxorubicina ou amostra MDD2 não tratada (CTL MDD2) em relação à amostra MN1 não tratada (CTL MN1). # Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostra MDD2 tratada com 500 ng/mL de doxorubicina em relação à amostra MDD2 não tratada (CTL MDD2). (Teste *t*-Student não pareado)



MN1		MDD2	
CTL	500	CTL	500
1	0,925 ± 0,02	1,84 ± 0,05	1,85 ± 0,01

Figura 30 e Tabela 10: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm do *TP53* nas amostras não tratadas (CTL) e tratadas com 500 ng/mL de doxurubicina nas linhagens celular MN1 e MDD2. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra não tratada da cultura MN1 (CTL MN1) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras MN1 tratada com 500 ng/mL de doxorubicina ou amostra MDD2 não tratada (CTL MDD2) em relação à amostra MN1 não tratada (CTL MN1). (Teste *t*-Student não pareado)

A expressão protéica e localização subcelular da TDG e p53 foram averiguadas por Microscopia Confocal e estão representadas na Figura 31. A TDG foi localizada no citoplasma das células controle MN1, entretanto, houve um aumento gradativo na expressão da TDG e da p53 após o tratamento com as diferentes doses de doxorubicina, além da relocalização nuclear da TDG após a indução do dano ao DNA. Nas células MDD2, a expressão de TDG foi muito baixa, praticamente indetectável, nas células controle. Ocorreu um discreto aumento nos níveis de expressão da TDG e da p53 nas amostras tratadas com as diferentes concentrações de doxorubicina, porém, não ocorreu a relocalização nuclear da TDG.

.

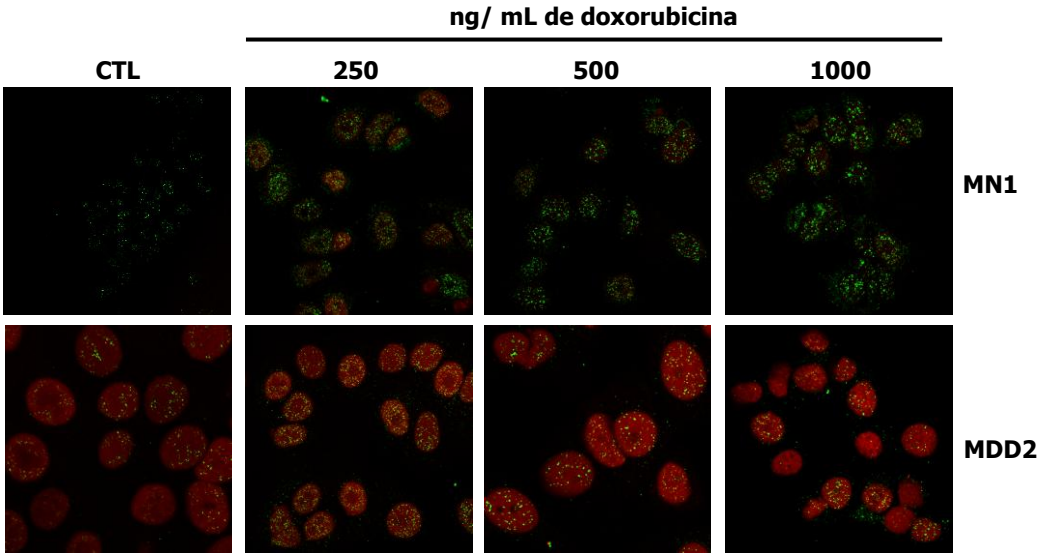
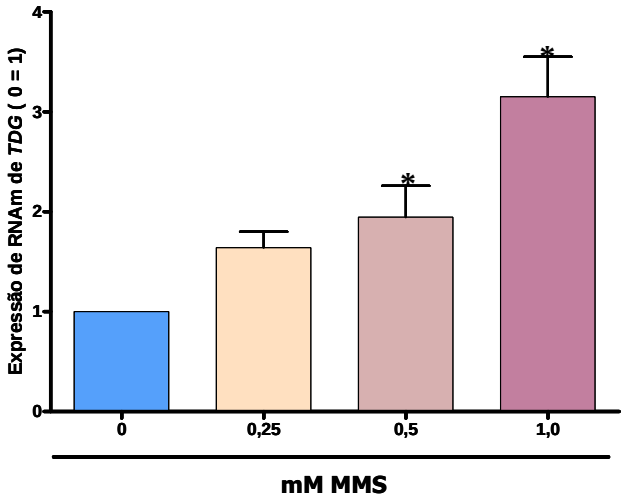


Figura 31: Imagens representativas da análise por Microscopia Confocal da expressão e localização subcelular da TDG e p53 nas amostras controle e nas amostras tratadas com 250; 500 e 1000 ng/mL de doxorubicina das linhagens celulares MN1 e MDD2. Sinal fluorescente verde representa a proteína TDG e o sinal fluorescente vermelho representa a proteína p53.

3.1.5. Efeito do aumento dos níveis de p53 através da indução de dano ao DNA sobre a expressão do RNAm e proteína de *TDG* na linhagem celular NHBE

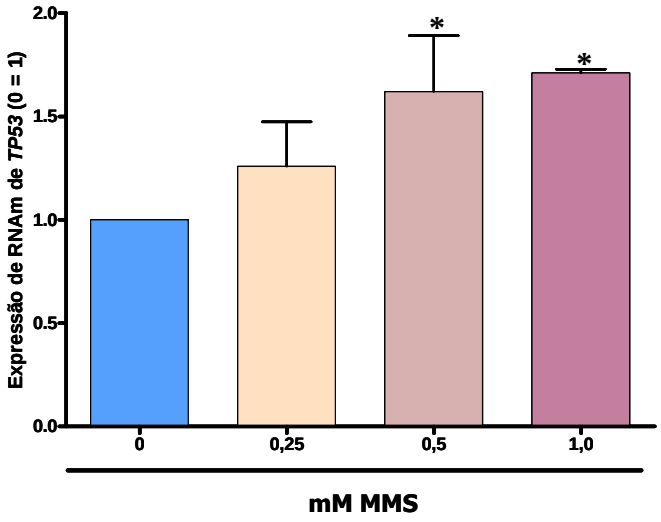
Por fim, uma linhagem celular não transformada, proveniente de epitélio bronquial, a NHBE (*Normal Human Bronchial Epithelial cells*) foi também utilizada, exposta ou não ao dano ao DNA induzido pelo tratamento das células com doses crescentes do agente químico mutagênico MMS. Os níveis de RNAm de *TDG* foram induzidos 1,64; 1,95 e 3,15 vezes nas amostras tratadas com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS, respectivamente, quando comparadas à amostra controle (0), não tratada com MMS (Figura 32 e Tabela 11). A expressão do RNAm de *TP53* apresentou um perfil de variação bem semelhante ao observado para a expressão do RNAm da *TDG*: as células NHBE tratadas com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS sofreram uma indução de 1,25; 1,61 e 1,71 vezes nos níveis de expressão de RNAm, respectivamente, quando comparadas à amostra não tratada com MMS (0) (Figura 33 e Tabela 12).

A análise da expressão protéica demonstrou que as células NHBE sofrem discreto aumento nos seus níveis de TDG após o dano induzido ao DNA pelo tratamento com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS, conforme ilustrado na Figura 34. Da mesma forma como ocorreu nas outras linhagens celulares utilizadas, a TDG foi detectada com peso molecular entre 75-80 kDa, representando a TDG na sua forma SUMOilada.



mM MMS			
0	0,25	0,5	1,0
1	1,64 ± 0,1	1,95 ± 0,19	3,15 ± 0,18

Figura 32 e Tabela 11: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TDG* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 1,0 mM (1,0) de MMS de células NHBE. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,25; 0,5 ou 1,0 mM de MMS em relação à amostra controle (0). (Teste *t*-Student não pareado)



mM MMS			
0	0,25	0,5	1,0
1	1,25 ± 0,2	1,61 ± 0,2	1,71 ± 0,01

Figura 33 e Tabela 12: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm de *TP53* na amostra controle (0) e nas amostras tratadas com 0,25 mM (0,25); 0,5 mM (0,5) e 1,0 mM (1,0) de MMS de células NHBE. Os valores são expressos como média e desvio padrão de duplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra controle (0) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras transfectadas com 0,25; 0,5 ou 1,0 mM de MMS em relação à amostra controle (0). (Teste *t*-Student não pareado)

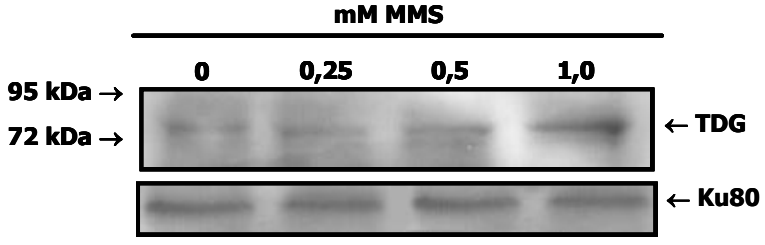


Figura 34: Figura representativa da análise por *Western blotting* da expressão protéica da TDG nas amostras controle (0) e tratadas com 0,25; 0,5 e 2,0 mM de MMS na linhagem celular NHBE.

3.2. **Regulação do Promotor do Gene *TDG* pela p53**

Após a determinação de que a p53 regula a expressão de TDG, a interação entre a p53 e o promotor de *TDG* foi analisada para avaliação dos mecanismos através dos quais ocorre essa regulação.

3.2.1. Elementos responsivos à p53 presentes no promotor do gene *TDG*

A região promotora do gene *TDG* foi avaliada usando o *software* MatInspector e três elementos responsivos à p53, apresentando a seqüência consenso ([RRRCWWGYYY] X 2), foram encontrados (Figura 35). A partir dessa informação, 2 sistemas repórteres *TDG*-luciferase foram gerados: um contendo o primeiro elemento responsivo à p53 (p53RE1) e um contendo o segundo e terceiro elementos responsivos à p53 (p53RE2 e p53RE3).

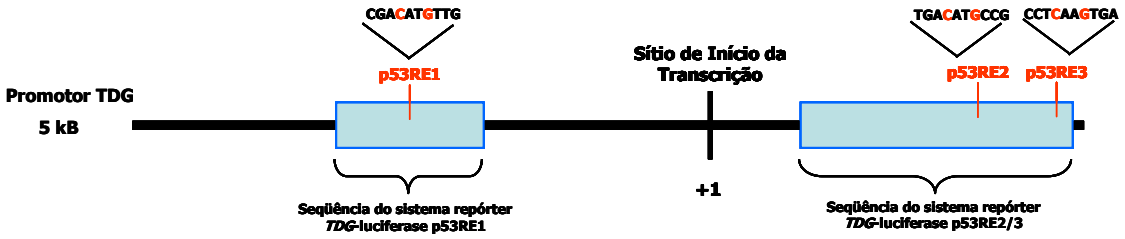


Figura 35: Esquema representativo da região promotora do gene *TDG* e seus elementos responsivos à p53.

3.2.2. Ligação da p53 no promotor do gene *TDG*

Com o objetivo de avaliar se a p53 se liga ao promotor de *TDG* (fragmento contendo o p53RE2 e p53RE3), os níveis de p53 foram aumentados em células TE-13, através da transfecção de 0,5; 1,0 e 2,0 μg do vetor de expressão de p53 e, em seguida, foi realizado o ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP assay). Não

foi detectada a ligação da p53 ao promotor de *TDG* na amostra que não foi transfectada com p53 (0). Porém, houve detecção da ligação da p53 ligada ao promoter de TDG, sendo que a intensidade da banda imunoreativa ao anticorpo anti-p53 aumentou proporcionalmente à quantidade de vetor de expressão transfectado, o que pode ser visto claramente na Figura 36. Sob as mesmas condições experimentais, a ligação da p53 ao promotor *p21/WAF1* foi também avaliada como um controle experimental positivo, uma vez que esse gene é bem caracterizado como responsivo à p53, e os resultados foram semelhantes aos obtidos com o promotor de *TDG* (figura 37).

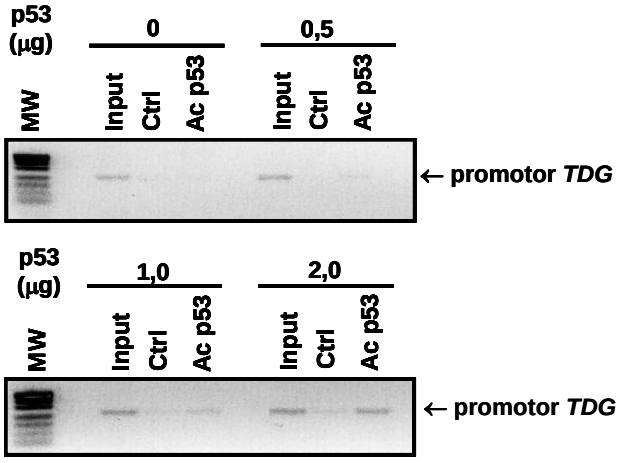


Figura 36: Amplificação do promotor do gene *TDG* após transfecção de 0; 0,5; 1,0 e 2;0 μg de vetor de expressão de p53 em células TE-13 e realização do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP). Input: DNA purificado antes da imunoprecipitação; Ctrl: DNA imunoprecipitado com soro pré-imune; Ac p53: DNA imunoprecipitado com anticorpo anti-p53.

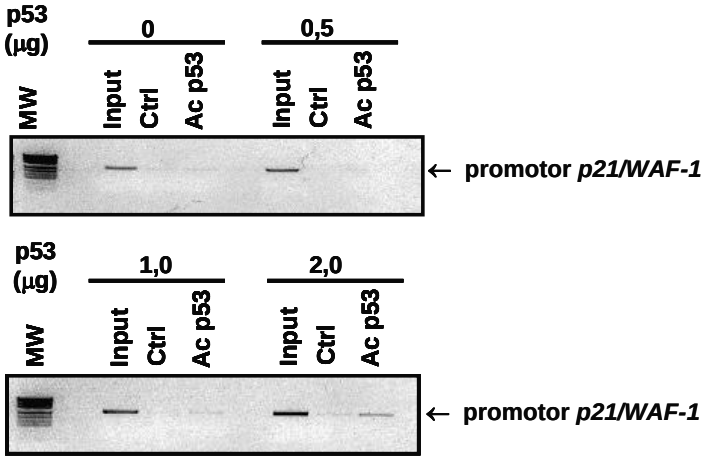


Figura 37: Amplificação do promotor do gene *p21/WAF1* após transfecção de 0; 0,5; 1,0 e 2;0 μg de vetor de expressão de p53 em células TE-13 e realização do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP). Input: DNA purificado antes da imunoprecipitação; Ctrl: DNA imunoprecipitado com soro pré-imune; Ac p53: DNA imunoprecipitado com anticorpo anti-p53.

3.2.3. Ativação do promotor do gene *TDG* pela p53

Para avaliar se os dois sistemas repórteres *TDG*-luciferase gerados, contendo os 3 p53RE presentes no promotor de *TDG*, eram induzíveis pela p53, os níveis dessa proteína foram aumentados em células TE-13 e TE-1 e os sistemas repórteres testados pelo ensaio da luciferase. Mais uma vez 0,5; 1,0 e 2,0 μg de vetor de expressão de p53 foram transfectados em células TE-13 em combinação com a transfecção de 1 μg de plasmídeo controle vazio (básico) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE1 (p53RE1) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3). A atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* foi significativamente induzida nos dois sistemas repórteres pela transfecção de p53, com um aumento de 5 a 12 vezes no sistema contendo o p53RE1 e de 50 a 250 vezes no sistema repórter contendo o p53RE2 e p53RE3 (Figura 38). As células TE-1 (cultivadas à 32ºC ou 37ºC) tiveram o nível de p53 aumentado pelo tratamento com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS e foram transfectadas com 1 μg de plasmídeo controle vazio (básico) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE1(p53RE1) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3). O tratamento com MMS induziu significativamente a atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* de 1,6 a 3 vezes do sistema repórter contendo o p53RE1 e de 2,3 a 2,8 vezes do sistema contendo o p53RE2 e p53RE3 nas células TE-1 mantidas à 32ºC. Esse efeito foi menos pronunciado nas células cultivadas à 37ºC, com indução significativa de 2,4 vezes na atividade de luciferase dependente de *TDG* do sistema repórter contendo somente o p53RE1 apenas após o tratamento com 1,0 mM de MMS e de 1,4 a 1,8 vezes do sistema repórter contendo os p53RE2 e p53RE3 (Figura 39).

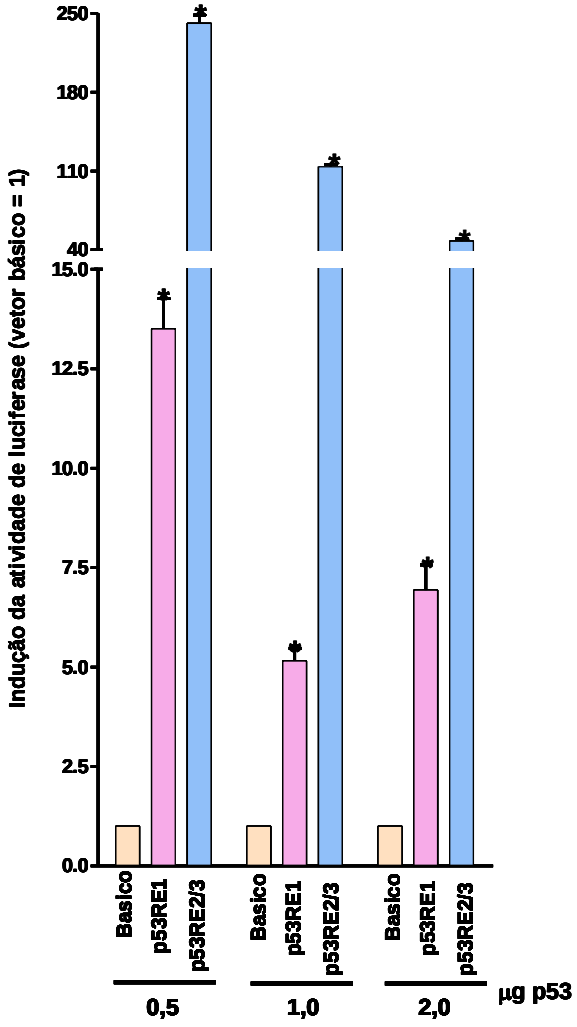


Figura 38: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-13 transfectadas com 0,5; 1,0 e 2,0 µg de vetor de expressão de p53 e 1 µg de plasmídeo controle vazio (básico) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE1 (p53RE1) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3). Os valores são expressos como média e desvio padrão de triplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra transfectada com controle vazio (básico) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras p53RE1, p53RE2/3 transfectadas com vetor de expressão de p53 em relação à amostra transfectada com vetor vazio (básico). (Teste *t*-Student não pareado)

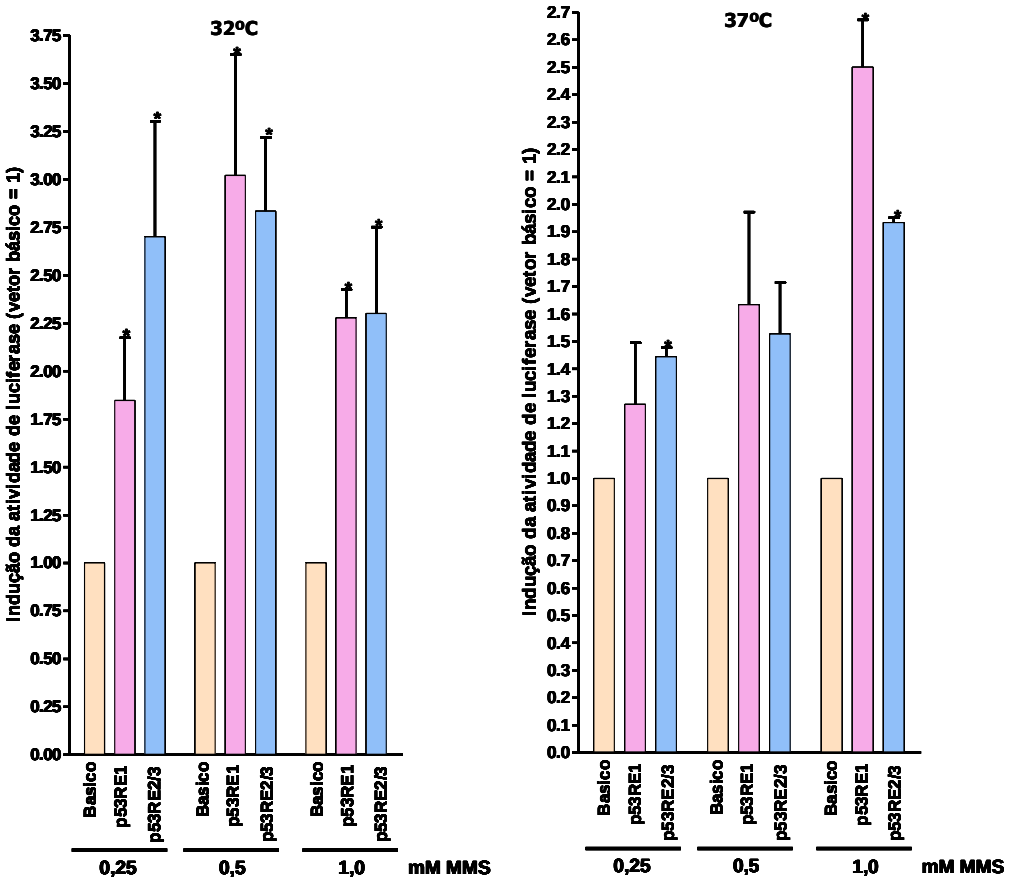


Figura 39: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-1 (32ºC e 37ºC) tratadas com 0,25; 0,5 e 1,0 mM de MMS e transfectadas com 1 μg de plasmídeo controle vazio (básico) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE1 (p53RE1) ou do plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3). Os valores são expressos como média e desvio padrão de triplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra transfectada com controle vazio (básico) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras p53RE1, p53RE2/3 tratadas com MMS em relação à amostra transfectada com vetor vazio (básico). (Teste *t*-Student não pareado)

Para confirmar que a indução na atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* era devido à ligação de p53 nesse promotor, os elementos responsivos à p53 contidos no sistema repórter *TDG*-luciferase p53RE2 e p53RE3 foram deletados pela técnica de mutagênese sítio-dirigida. Os p53REs foram deletados individualmente (del p53RE2, del p53RE3) ou em combinação (del p53RE2/3) gerando 3 novos plasmídeos mutados. As células TE-13 foram novamente utilizadas como modelo experimental e foram transfectadas com 2 μg de vetor de expressão de p53 e 1 μg de plasmídeo mutado (del p53RE2 ou del p53RE3 ou del p53RE2/3) ou com vetor controle vazio e 1 μg de plasmídeo mutado (del p53RE2 ou del p53RE3 ou del p53RE2/3) ou apenas com 1 μg do plasmídeo *TDG*-luciferase p53RE2/3. A retirada dos p53REs resultou numa significativa diminuição na atividade

de luciferase dependente de *TDG* que não foi recuperada com a transfecção de 2 μg de vetor de expressão de p53 (Figura 40).

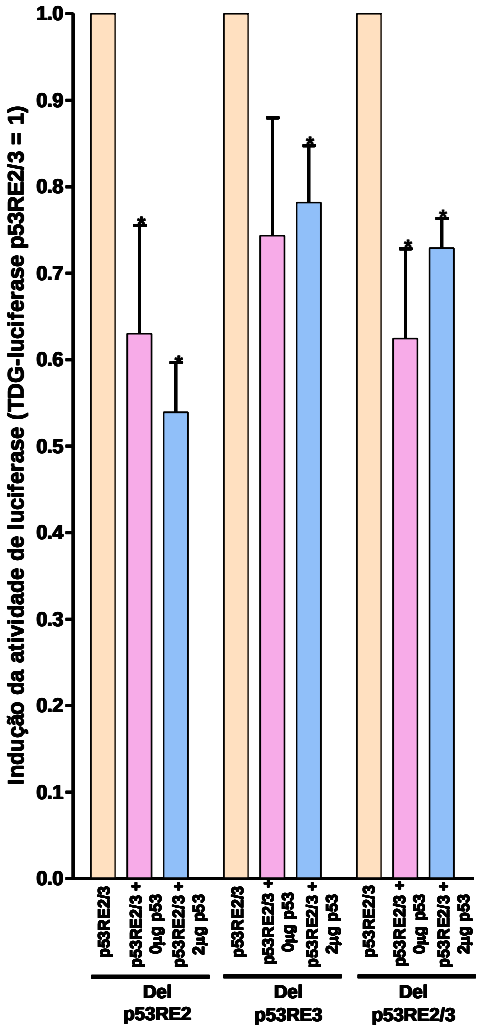


Figura 40: Atividade de luciferase dependente do promotor de *TDG* em células TE-13 transfectadas com 2,0 μg de vetor de expressão de p53 e 1 μg de plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3) ou do plasmídeo com o p53RE2 deletado ((del p53RE2) ou o p53RE3 deletado (del p53RE3) ou ambos os p53REs deletados (del p53RE2/3). Os valores são expressos como média e desvio padrão de triplicatas, relativos aos valores obtidos na amostra transfectada plasmídeo *TDG*-luciferase contendo o p53RE2 e p53RE3 (p53RE2/3) (1,00). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras del p53RE2 ou del p53RE3 ou del p53RE2/3 transfectadas com vetor de expressão de p53 em relação à p53RE2/3. (Teste *t*-Student não pareado)

3.3. Efeito do silenciamento do gene *TDG* e do dano ao DNA causado pelo MMS na proliferação de células TE-1

Com o objetivo de determinar se a regulação de *TDG* pela p53 acarreta efeitos biológicos no reparo e/ou proliferação das células sob *stress* causado pelo MMS, foi utilizado um ensaio de proliferação celular para avaliar a viabilidade das células TE-1, em resposta a esse agente mutagênico. Células TE-1 cultivadas à 32ºC ou 37ºC foram tratadas com 0,5 mM de MMS por 1, 3 ou 5 horas e a proliferação celular foi quantificada pela quantidade de formazan formada. O tratamento com MMS por 1 hora resultou numa diminuição significativa de 23% na proliferação das células TE-1 mantidas à 32ºC e essa diminuição continuou até a terceira hora do tratamento, quando houve uma ligeira recuperação na proliferação celular. De forma contrária, as células TE-1 cultivadas à 37ºC sofreram um significativo aumento de 12% e 40% na sua taxa de proliferação após 1 e 3h de tratamento com MMS, respectivamente. A taxa de proliferação das células TE-1 à 37ºC começou a diminuir após a terceira hora de tratamento (Figura 41).

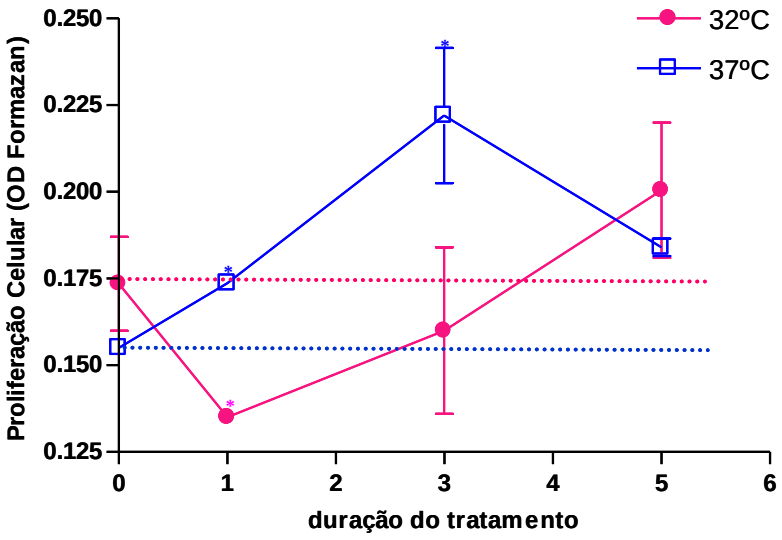


Figura 41: Taxa de proliferação das células TE-1 mantidas à 32ºC e 37ºC após tratamento com 0,5 mM de MMS por 1, 3 e 5 horas. * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras tratadas com 0,5 mM de MMS por 1, 3 ou 5 horas e a amostra não tratada (0). (Teste *t*-Student não pareado)

Após a avaliação da proliferação celular, a distribuição do ciclo celular foi analisada nas células TE-1. O gene *TDG* foi silenciado nas células TE-1, antes do tratamento com 1,0 mM de MMS por 3 horas, e, em seguida, o ciclo celular e a incorporação de BrdU foram analisados pela técnica de citometria de fluxo. Nas células TE-1 cultivadas à 32ºC foi observado um aumento no número de células na fase subG1 do ciclo celular, entretanto esse padrão não foi encontrado nas células à 37ºC (Figura 42). Além disso, o tratamento com MMS realizado após o silenciamento de *TDG* nas células resultou em uma redução geral do número de células TE-1 crescidas à 32ºC em todas as fases do ciclo celular, bem como numa diminuição na porcentagem de BrdU incorporado por essas células. Esse efeito foi bem pronunciado nas células TE-1 mantidas à 37ºC (Figuras 43 e 44).

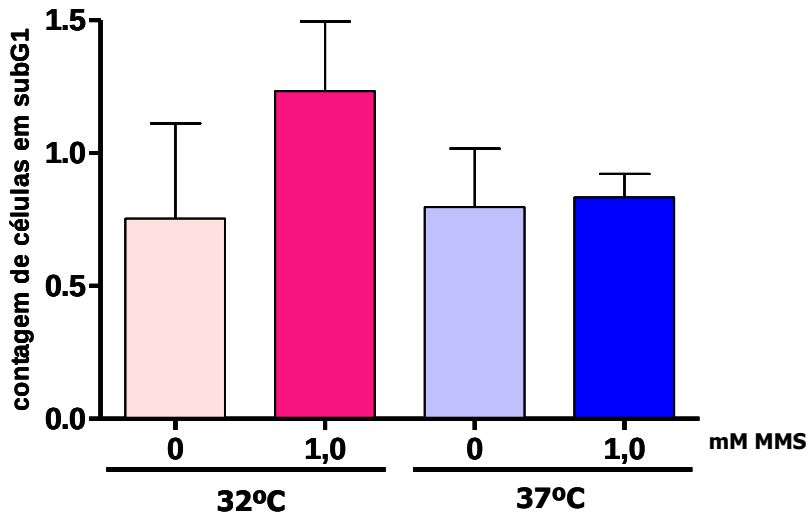


Figura 42: Contagem de células TE-1 (32ºC e 37ºC) na fase subG1 do ciclo celular após silenciamento de *TDG* e tratamento com 1,0 mM de MMS por 3 horas.

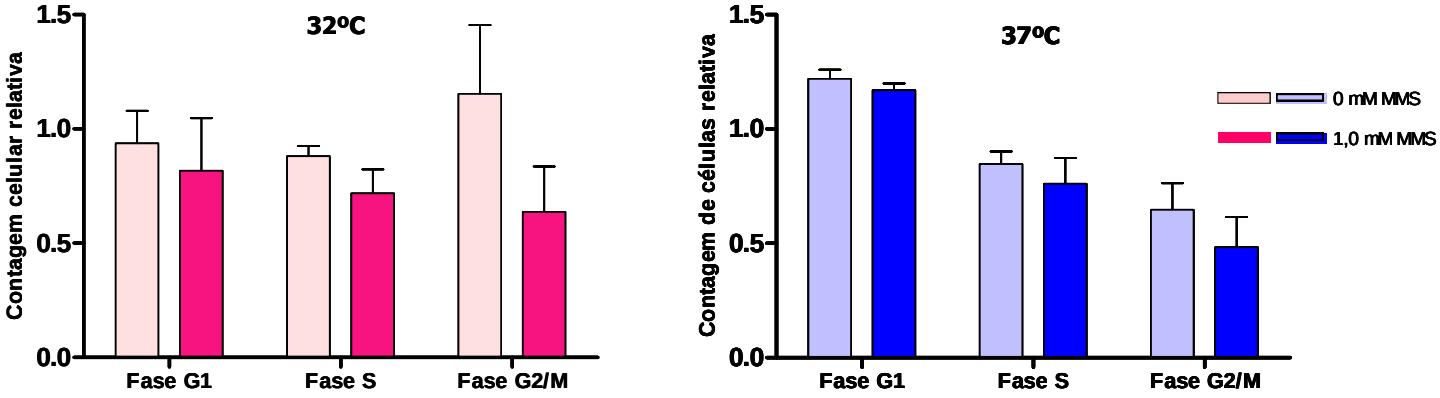


Figura 43: Contagem de células TE-1 (32ºC e 37ºC) nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) após silenciamento de *TDG* e tratamento com 1,0 mM de MMS por 3 horas.

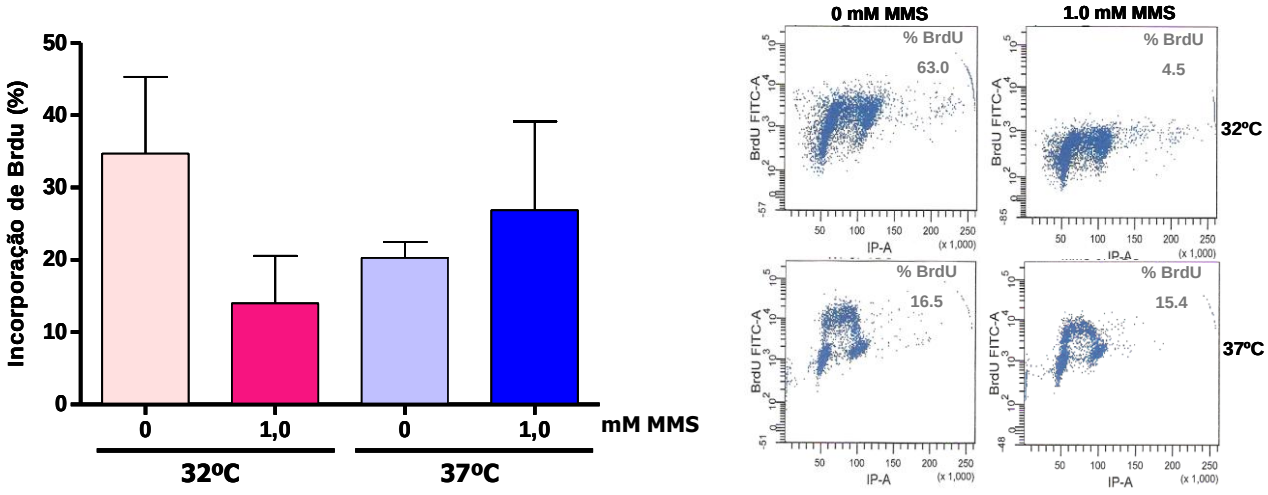
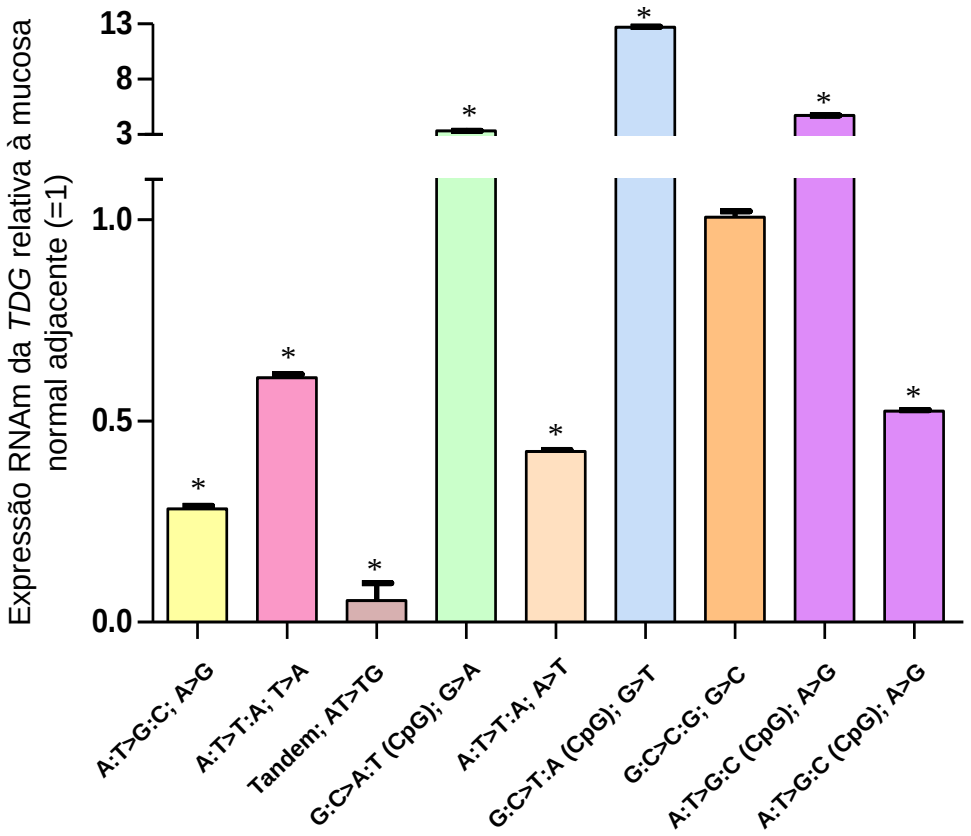


Figura 44: Taxa de incorporação de BrdU pelas células TE-1 (32ºC e 37ºC) após silenciamento de *TDG* e tratamento com 1,0 mM de MMS por 3 horas.

3.4. **Efeito de mutações em *TP53* sobre a expressão do RNAm da *TDG* em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago**

Para avaliar o efeito da presença de mutações em *TP53* em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) sobre a expressão do RNAm da *TDG*, foram utilizadas amostras de nove pacientes, pareadas em normal e tumor. As amostras são provenientes de diferentes regiões do Brasil e tiveram as mutações em *TP53* determinadas em nosso laboratório. A expressão do RNAm da *TDG* foi avaliada também em quatorze amostras de pacientes com CEE que não apresentavam mutação em *TP53* e serviram de comparação nas análises. A expressão do RNAm da *TDG* foi dosada pela técnica de RT – PCR quantitativo.

Na Figura 45 e Tabela 13 está representada a expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de CEE que apresentam mutação em *TP53* com valores relativos aos detectados na análise da mucosa adjacente de cada amostra. As amostras estão representadas pelo tipo de mutação em *TP53* detectada. Dentre as nove amostras de CEE analisadas, cinco delas apresentaram diminuição significativa na expressão do RNAm da *TDG* quando comparadas com à expressão na mucosa adjacente. Os valores de expressão foram 0,28; 0,60; 0,010; 0,43 e 0,52 nas amostras que apresentam as mutações A:T>G:C; A:T>T:A; A:T>T:G; A:T>T:A; e A:T>G:C (CpG), respectivamente, em relação às respectivas mucosas adjacentes. Outras três amostras, com as mutações G:C>A:T (CpG); G:C>T:A (CpG) e A:T>G:C (CpG) apresentaram aumento significativo de 3,31; 12,68 e 4,69, respectivamente, na expressão do RNAm da *TDG* do tumor quando comparada com a expressão detectada nas respectivas mucosas adjacentes. Uma única amostra de CEE analisada (G:C>C:G) não apresentou diferença significativa na expressão do RNAm da *TDG* em relação à sua mucosa adjacente.



A:T>G:C ; A>G	A:T>T:A; T>A	Tandem; AT>TG	G:C>A:T (CpG); G>A	A:T>T:A; A>T	G:C>T:A (CpG); G>T	G:C>C:G; G>C	A:T>G:C (CpG); A>G	A:T>G:C (CpG); A>G
0,28 ± 0,011676	**0,60** ± 0,015044	**0,010** ± 0,074485	**3,31** ± 0,01	**0,43** ± 0,006658	**12,68** ± 0,058595	**1,01** ± 0,025166	**4,69** ± 0,040415	**0,52** ± 0,005033

Figura 45 e Tabela 13: Valores de média e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53*. Os valores são expressos como média e desvio padrão de quadruplicatas, relativos aos valores obtidos na mucosa normal adjacente às amostras de CEE analisadas (=1). * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras CEE e sua respectiva mucosa adjacente. (Teste *t*-Student não pareado)

A Figura 46 ilustra a expressão do RNAm da *TDG* nas nove amostras de CEE analisadas que apresentam mutação em *TP53* e nas respectivas mucosas adjacentes. Não houve diferença significativa entre as médias das amostras de CEE e das mucosas adjacentes na expressão do RNAm da *TDG*. Os valores de mediana, erro padrão e desvio padrão estão representados na Tabela 14.

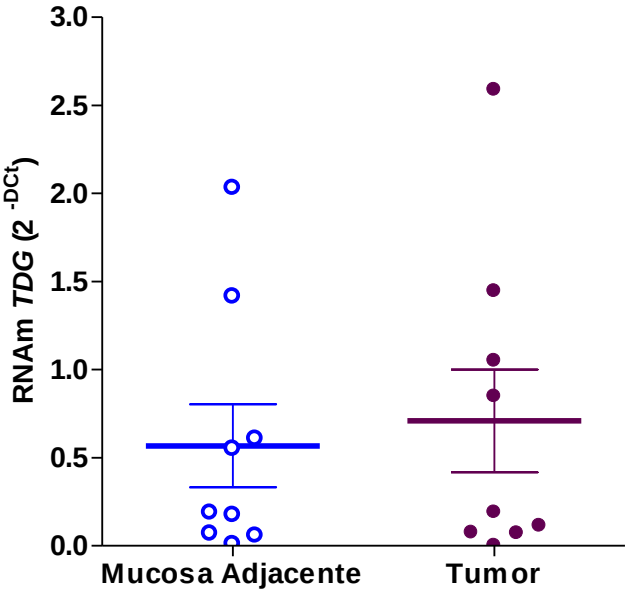


Figura 46: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras.

	Mucosa Adjacente	Tumor
Mediana	0,5674	0,7094
Erro Padrão	0,2351	0,2921
Desvio Padrão	0,7053	0,8763

Tabela 14: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras.

A expressão do RNAm da *TDG* também foi avaliada nas quatorze amostras CEE que não apresentam mutações em *TP53*, bem como na mucosa adjacente a essas amostras (Figura 47), e os valores de mediana, erro padrão e desvio padrão estão representados na Tabela 15. Não houve variação estatisticamente significativa na expressão do RNAm da *TDG* entre as medianas das duas diferentes porções analisadas.

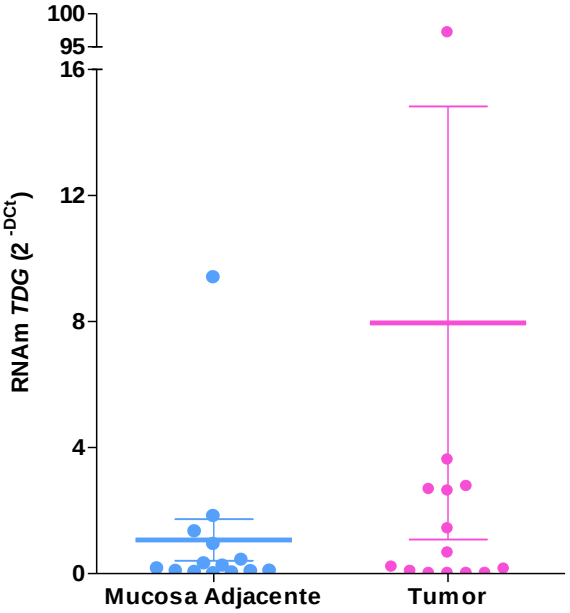


Figura 47: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras.

	Mucosa Adjacente	Tumor
Mediana	1,067	7,965
Erro Padrão	0,6575	6,869
Desvio Padrão	2,460	25,70

Tabela 15: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não apresentam mutação em *TP53* e na mucosa adjacente às amostras.

Na figura 48 e na tabela 16 está representada a expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de CEE que apresentam ou não mutação em *TP53*. A comparação entre a mediana da expressão nas amostras de CEE que apresentam mutação no gene *TP53* e a mediana das que não apresentam aponta para uma maior expressão do RNAm da TDG nas amostras não mutadas, mas não houve diferença estatisticamente significativa.

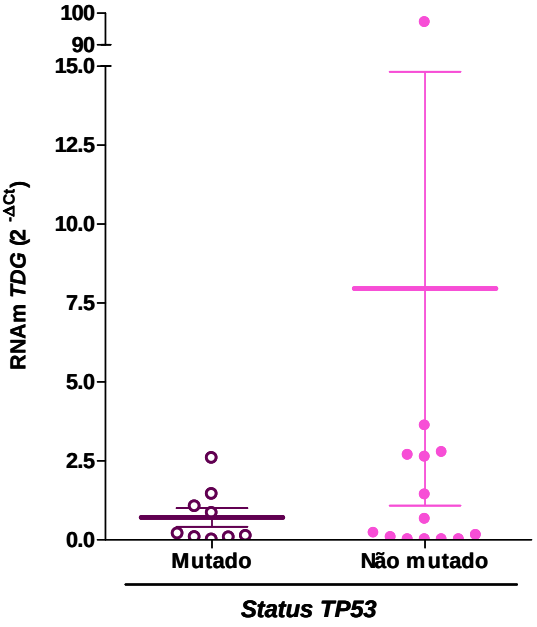


Figura 48: Valores de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou mutação em *TP53*.

	Status *TP53*	
	Mutado	**Não Mutado**
Mediana	0,7094	7,956
Erro Padrão	0,2921	6,869
Desvio Padrão	0,8763	25,73

Tabela 16: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*.

A Figura 49 e a Tabela 17 representam a expressão do RNAm da *TDG* na mucosa adjacente às amostras de CEE mutadas ou não no gene *TP53*. Um aumento de expressão na mucosa adjacente das amostras que não apresentam mutação em *TP53* foi observado em comparação com a mesma porção das amostras que apresentam mutação no gene, entretanto, sem diferenças estatisticamente significativas.

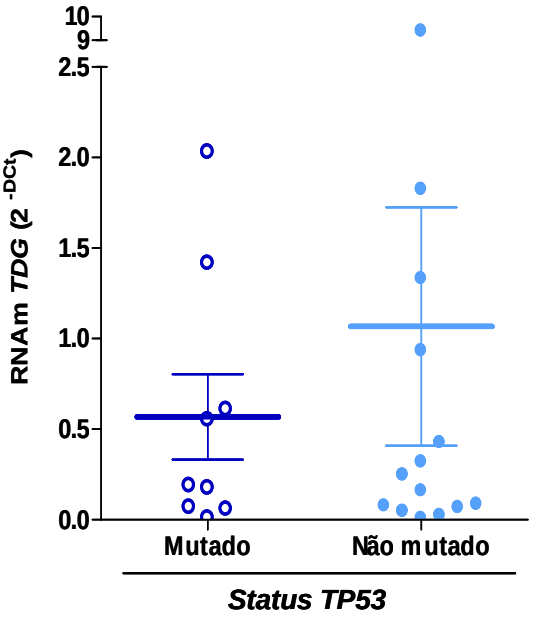


Figura 49: Valores de expressão do RNAm da *TDG* na mucosa adjacente às amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*.

	Status *TP53*	
	Mutado	**Não Mutado**
Mediana	0,5674	1,067
Erro Padrão	0,2351	0,6575
Desvio Padrão	0,7053	2,460

Tabela 17: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* na mucosa adjacente às amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53*.

Abaixo está representada a variação de expressão do RNAm de *TDG* nas amostras de CEE, apresentando ou não mutação em *TP53,* em relação às suas mucosas adjacentes (Figura 50 e Tabela 18). Embora um aumento nos valores de mediana tenha sido observado no grupo das amostras que não apresentavam mutações em *TP53*, não houve diferenças estatisticamente significativas.

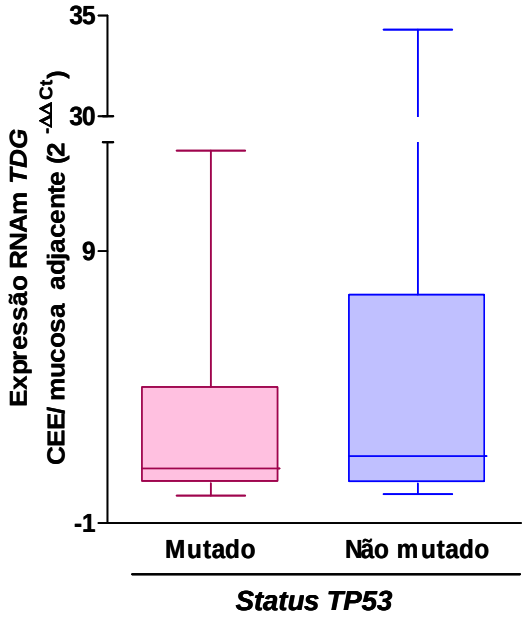


Figura 50: Variação de expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53,* em relação às suas mucosas adjacentes.

	Status *TP53*	
	Mutado	**Não Mutado**
Mediana	2,849	5,060
Erro Padrão da Média	1,337	2,433
Desvio Padrão	4,011	9,103

Tabela 18: Valores de mediana, erro padrão e desvio padrão da expressão do RNAm da *TDG* nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que apresentam ou não mutação em *TP53,* em relação às suas mucosas adjacentes.

4. **DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos durante esta tese demonstram que a expressão de *TDG* é regulada transcricionalmente numa gama de linhagens celulares e é induzida pelo dano ao DNA, de forma p53-dependente. Além disto, os resultados apontam um possível papel da proteína p53 ativa na translocação do citossol para o núcleo da TDG. Estes resultados ainda nos levam à conclusão de que o silenciamento de *TDG* aumenta a sensibilidade à morte celular induzida por MMS quando a p53 é encontrada na forma selvagem, mas não quando esta proteína é mutada, e de que o status mutacional de *TP53* desempenha um papel importante na expressão de *TDG* em CEE primários.

Assim, os resultados obtidos nesta tese demonstraram uma redução na expressão de TDG em células contendo a proteína p53 mutante e um aumento na expressão desse gene quando os níveis de p53 foram induzidos nas células ou por tratamentos que resultam ao dano ao DNA ou por transfecção de vetor de expressão de p53. A primeira linhagem celular utilizada, a TE-1, sofreu um decréscimo de 80% nos níveis de expressão de RNAm de *TDG* quando cultivada à 37ºC (maior parte de p53 encontrada na forma mutada, inativa) quando comparada às células cultivadas à 32ºC (maior parte de p53 encontrada na forma selvagem, ativa). Ainda, em resposta ao silenciamento de *TDG*, foi observada uma diminuição de 45% nos níveis de expressão de RNAm desse genes nas células à 32ºC, mas não à 37ºC, provando que a menor expressão encontrada à 37ºC é devida à ausência da proteína p53 selvagem. Os níveis de proteína acompanharam as mudanças observadas na expressão do RNAm, entretanto, os níveis de p53 foram ligeiramente mais abundantes nas células mantidas à 37ºC do que nas mantidas à 32ºC, o que era esperado devido ao acúmulo da p53 numa forma "*mutant-like*".

O anticorpo anti-TDG utilizado detectou duas proteínas de peso molecular entre 75-80 kDa nos extratos de células TE-1, bem como no extrato das outras linhagens celulares utilizadas neste estudo. A TDG foi inicialmente caracterizada como uma proteína de peso molecular igual a 55 kDa purificada de extrato de células HeLa (NEDDERMANN, P. E JIRICNY, J. 1993). Estudos posteriores, no entanto, descreveram a enzima como um polipeptídeo de 60 kDa, com espécies adicionais detectadas em torno de 55 kDa. Essas espécies adicionais em torno de 55 kDa foram descritas como produto de degradação proteolítica da enzima (NEDDERMANN, P. *et al*., 1996) e/ou produtos de *splicing* alternativo (UM, S. *et al*., 1998). Alguns trabalhos já descreveram a interação da TDG com as proteínas SUMO (MINTY, A. *et al*., 2000;

HARDELAND, U. *et al*., 2002; STEINACHER, R e SCHÄR, P., 2005), que são pequenos polipeptídeos de peso molecular em torno de 11 kDa (SU, H. L. *et al*., 2002). Ulrich e colaboradores (2002) detectaram uma banda de aproximadamente 86 kDa, utilizando um anticorpo policlonal anti-TDG, que foi descrita como sendo a TDG conjugada à proteína SUMO. Dessa forma, no presente estudo, foi utilizado um anticorpo anti-SUMO que detectou duas bandas compatíveis com as detectadas pelo anticorpo anti-TDG, sugerindo assim, que nas células utilizadas, a TDG é encontrada, principalmente, na forma SUMOilada.

Ainda utilizando as células TE-1, neste estudo a p53 foi ativada pelo tratamento com o agente químico mutagênico MMS. O MMS é um agente alquilante e induz a metilação do DNA, o que provavelmente desencadeia a via de reparo de DNA da TDG. Foi demonstrado por Lee e colaboradores (2004) que o MMS induz a expressão de *hOGG1*, uma outra enzima da via BER. Os resultados obtidos nesta tese demonstraram que a expressão do RNAm e proteína de *TDG* aumentaram em até 1,76 vezes em resposta ao tratamento com MMS nas células cultivadas à 32ºC, mas não à 37ºC, sugerindo que a expressão de *TDG* é induzida pelo dano ao DNA de maneira p53-dependente. O efeito positivo da p53 na expressão de TDG foi confirmado pelo uso de outra linhagem celular, a TE-13, que não expressa p53. Os níveis de RNAm e proteína de *TDG* foram altamente induzidos após a transfecção de quantidades crescentes de vetor de expressão de p53. Essas observações são concordantes com outros estudos que avaliaram a expressão de outras enzimas BER e mostraram uma expressão deficiente de *pol-*β em linhagens celulares que não expressavam p53 (JAYARAMAN, L. *et al*., 1997; SEO, Y. R. *et al*., 2002) e uma redução na expressão de *hOGG1* numa linhagem celular *knockout* para p53 (CHATERJEE, A. *et al*., 2005).

Em seguida, foi demonstrado neste trabalho que o efeito da p53 sobre a expressão de *TDG* é um fenômeno geral e não unicamente observado em linhagens celulares originadas de CEE, através do uso das linhagens celulares isogênicas MN1 e MDD2, derivadas das células MCF-7, provenientes de tumor de mama. As células MDD2 não são capazes de formar tetrâmeros de p53, enquanto que as células MN1 têm essa capacidade. O dano ao DNA, e conseqüente ativação de p53, foi induzido pelo tratamento com doxorubicina em ambas as linhagens celulares, resultando em significativa indução dos níveis de RNAm de *TDG* nas células MN1, mas não nas células MDD2, conforme esperado. O achado inesperado foram os níveis basais de RNAm de *TDG* mais elevados nas células MDD2 quando comparadas às células MN1. A linhagem celular MDD2 possui maior quantidade de p53, entretanto, sem a capacidade de oligomerização. Embora a conformação tetramérica da p53 seja

importante para o desempenho de várias funções biológicas desta proteína, e essencial para a indução de TDG por agentes genotóxicos, como demonstrado pelo tratamento de células MN1 e MDD2 com doxorubicina, os resultados obtidos sugerem que a conformação tetramérica da p53 não é imprescindível para a expressão basal de *TDG*. Uma possível explicação para este fato seria a interação da p53 com outros fatores de transcrição, como o NFkB, como ocorre, por exemplo, na regulação do gene *COX-2*, onde o NFkB é requerido para a ativação do promotor desse gene pela p53, promovendo a sobrevivência celular em lesões inflamatórias (BENOIT, V. *et al*., 2006). Por fim, uma linhagem celular não transformada de epitélio bronquial, NHBE, também teve seus níveis de p53 induzidos pelo tratamento com MMS, o que acarretou o aumento dos níveis de expressão do RNAm e proteína de *TDG*.

Corroborando os dados narrados acima, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o promotor de *TDG* é regulado de forma p53-dependente. Os sistemas repórteres *TDG*-luciferase gerados tiveram suas atividades de luciferase dependentes de *TDG* induzidas entre 5 e 12 vezes no sistema repórter contendo o p53RE1 e entre 50 e 250 vezes no sistema repórter contendo os p53RE2 e p53RE3, em células TE-13 transfectadas com quantidades crescentes de vetor de expressão de p53. A atividade de luciferase dependente de *TDG* também foi induzida nas células TE-1 tratadas com diferentes doses de MMS, de maneira mais pronunciada em células apresentando p53 selvagem (32ºC) do que nas células com p53 mutante (37ºC), sugerindo que a atividade do promotor de TDG é induzida pelo dano ao DNA de maneira p53-dependente. O papel da p53 na indução da atividade do promotor de *TDG* foi confirmado pela deleção do p53RE2 e/ou p53RE3 do sistema repórter *TDG*-luciferase uma vez que, após a deleção dos elementos responsivos à p53, a atividade de luciferase dependente de *TDG* cessou mesmo após a transfecção do vetor de expressão de p53 nas células TE-13. Por fim, através do ensaio de imunoprecipitação da cromatina, foi observada a ligação da p53 ao promotor de *TDG*, utilizando células TE-13 transfectadas com vetor de expressão de p53. Dessa forma, os dados obtidos nos levam à conclusão de que o gene *TDG* é transcricionalmente regulado pela p53 em uma variedade de células, e induzido pelo dano ao DNA de maneira p53-dependente.

A técnica de microscopia confocal mostrou de forma surpreendente que o sinal fluorescente relativo à TDG foi encontrado majoritariamente no citoplasma das células analisadas, entretanto, o silenciamento de *TDG* nessas células aboliu o sinal fluorescente, mostrando que o anticorpo é específico para TDG. Isto demonstra que a translocação da TDG para o núcleo, observada após o dano ao DNA causado pelo MMS somente nas células TE-1 p53-competentes (crescidas à 32ºC), não é um

artefato, sugerindo assim um novo e inesperado papel para a proteína p53, na translocação nuclear de proteínas.

A TDG é uma enzima essencialmente nuclear (BARNES, D. e LINDAHL, T., 2004), pós-translacionalmente modificada pela conjugação às proteínas SUMO (HARDELAND, U. *et al*., 2002). A interação de SUMO com suas proteínas alvo afeta numerosos processos biológicos que vão desde a localização celular e estabilidade protéica (CORTÁZAR, D. *et al*., 2007) a transdução de sinais na célula (GILL, G., 2004), regulação da transcrição gênica e manutenção da estabilidade genômica (HENDRICH, B. *et al*., 1999). A ligação da TDG ao DNA é inibida e as propriedades cinéticas são alteradas pela sua conjugação às proteínas SUMO. Adicionalmente à interação substrato/ produto realizada através de contatos específicos no sítio ativo da enzima, uma ligação ao DNA não específica que ocorre na região amino-terminal é requerida para o processamento de malpareamento G●T, resultando numa alta afinidade da TDG pelo sítio abásico gerado. Quando conjugada às proteínas SUMO, a TDG sofre uma mudança conformacional no domínio amino-terminal levando a uma afinidade reduzida da enzima pelo DNA aumentando, assim, o *turnover* da enzima e facilitando o processamento de uma gama maior de substrato, porém, o reparo de malpareamentos G●T nessas condições é abolido (HARDELAND, U. *et al*., 2002; STEINACHER, R e SCHÄR, P., 2005; ULRICH, C. M., 2005). Mohan e colaboradores (2007) investigaram a localização subcelular da TDG e sua regulação quando conjugada às proteínas SUMO e mostraram que ocorre uma migração significativa da TDG do núcleo das células para o citoplasma, após a deleção do domínio amino-terminal da enzima. Baseado nesse estudo e nos nossos resultados, é possível concluir que a TDG encontra-se no citoplasma das células (mediante interação com proteínas SUMO) enquanto o reparo de malpareamentos G●T não está ocorrendo. Porém, quando requerida em resposta ao dano ao DNA causado por MMS, ela é capaz de migrar para o núcleo, via translocação mediada pela proteína p53.

A interação física e funcional da TDG com diversos fatores de transcrição já é bem estabelecida. A TDG, por exemplo, interage com as proteínas da família p53 (p53, p63 e p73), modulando suas funções biológicas, na medida que funciona como um coativador transcricional dessas proteínas (KIM, E. J. e UM, S. J., 2008). Outros estudos descreveram funções similares para a TDG, levando à conclusão de que essa proteína exerce um papel na regulação da expressão gênica (UM, S. *et al*., 1998; MISSERO, C. *et al*, 2001; TINI, M. e*t al*, 2002; CHEN, D. *et al*., 2003; LUCEY, M. J. *et al*., 2005; TAKASHI, H. *et al*., 2005). Entretanto, existe uma carência de dados na literatura sobre a regulação do gene *TDG*. Recentemente, o gene *TDG* foi descrito como transcricionalmente regulado pela DNA metiltransferase 3-*like*

(DNMT3L), apesar da sua ausência de atividade enzimática (KIM, H. *et al*., 2010). A TDG pode encontrar-se epigeneticamente regulada, com a hipermetilação de região promotora de *TDG* acarretando uma expressão gênica e capacidade de reparo prejudicadas (PENG, B. *et al*., 2006). Embora já tenha sido demonstrado que a TDG interage fisicamente com a p53 e outros membros desta família, modulando suas funções biológicas e atuando como um coativador transcricional (KIM, E. J. e UM, S. J., 2008), o efeito da p53 na regulação de *TDG* ainda não tinha sido avaliado.

A regulação transcripcional da p53 sobre *TDG* não é peculiar deste gene de reparo de DNA, e a regulação de outras enzimas da via BER pela p53 já foi descrita. A p53 se liga ao promotor do gene *APE1*, causando a diminuição da atividade de luciferase dependente desse promotor, quando encontrada na forma selvagem e superexpressa, através do recrutamento indireto de p53 ao promotor utilizando outros fatores de transcrição, provavelmente numa tentativa de promover a apoptose em detrimento ao reparo de DNA (ZAKY, A. *et al*., 2008). A regulação transcricional da *hOGG1* pela p53 também foi reportada, neste caso atuando de forma positiva em sua transcrição. Chaterjee e colaboradores (2005) demonstraram que a p53 se liga ao promotor de *hOGG1* e intensifica a sua atividade e confirmaram essa observação pelo fato da atividade do promotor de *hOGG1* ser abolida pela deleção dos elementos responsivos à p53 contidos no promotor desse gene. A p53 também se liga à região promotora de *hMSH2*, outro gene de reparo de DNA, aumentando sua atividade (SCHERER, S.J. *et al*., 1996; WARNICK, C. T. *et al*., 2001).

A atividade da via BER é altamente associada aos níveis de p53 nas células (ZHOU, J. *et al*., 2001; OFFER, H. *ET AL*., 1999; ACHANTA, G. E HUANG, P., 2004; SEO, Y. R. *et al*., 2002; SOUZA-PINTO, N. C. *et al*., 2004). A expressão de *hOGG1* e sua habilidade de catalisar a excisão de 8-oxo *in vitro* são positivamente reguladas pela p53, fornecendo uma vantagem para a sobrevivência das células em situações de dano oxidativo. Ainda, foi mostrado que o silenciamento de *hOGG1* e/ ou *TP53* aumenta a sensibilidade das células ao dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (RACHEK, L. I., *et al*., 2002; CHATERJEE, A. *et al*., 2005). Nesta tese, foi investigado se a regulação transcricional de *TDG* pela p53 desencadeia efeitos biológicos no reparo e/ ou sobrevivência celular após o dano induzido ao DNA por MMS. Foi verificada uma redução significativa de até 23% na taxa de proliferação celular das células TE-1 cultivadas à 32ºC até 3 horas após o tratamento com MMS, enquanto que, nas células mantidas à 37ºC houve um aumento de até 1,4 vezes na taxa de proliferação celular durante o mesmo período de tratamento. Conforme observado anteriormente, níveis de RNAm e proteína de *TDG* são induzidos pelo tratamento com MMS em células TE-1 à 32ºC (temperatura permissiva), mas não à

37ºC (temperatura restritiva). Ademais, o MMS causa a metilação do DNA, um tipo de dano que dispara a atividade da via de reparo da TDG. Sendo assim, é possível presumir que o decréscimo nas taxas de proliferação observada nas células TE-1 cultivadas à 32ºC ocorra devido à indução da parada do ciclo celular e subseqüente reparo do dano em resposta ao tratamento com MMS, uma vez que essas células são p53 e TDG competentes. De forma contrária, nas células crescidas à 37ºC, devido à carência de p53 ativo funcionando como um sensor ativando a parada do ciclo celular e da TDG para reparar o dano ao DNA, as células continuam proliferando mesmo estando danificadas.

Ainda analisando o ciclo celular das células TE-1, foi observado que o silenciamento de *TDG* seguido de dano ao DNA induzido por MMS acarretou um aumento do número de células mantidas à 32ºC na fase subG1 do ciclo celular e o mesmo fenômeno não foi observado nas células mantidas à 37ºC. A fase subG1 representa a população de células com conteúdo de DNA reduzido devido a sua fragmentação, as células apoptóticas (http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry). Além disso, o tratamento com MMS causou uma redução global, embora não significativa, do número de células TE-1 silenciadas para *TDG* em todas as fases do ciclo celular, bem como uma diminuição na incorporação de BrdU, principalmente à 32ºC. Juntos, esses resultados sugerem que o silenciamento de TDG numa linhagem celular de CEE contendo a p53 na forma mutante termo-sensível, aumenta a sensibilidade à morte celular induzida por MMS na temperatura permissiva (32ºC), mas não na temperatura restritiva (37ºC).

Baseado nos resultados descritos acima, era esperado que a expressão de *TDG* em CEE primários contendo *TP53* mutante fosse mais baixa do que nos CEE apresentando *TP53* selvagem, como conseqüência da regulação de *TDG* pela p53. Dessa forma, na série de CEE e respectivas mucosas adjacentes analisadas foi encontrada uma menor média de expressão do RNAm de *TDG* nos tumores apresentando *TP53* mutante do que naqueles que conservaram o gene selvagem. Além disso, os níveis de expressão de RNAm de *TDG* foram mais altos no tecido tumoral do que na mucosa adjacente quando o *TP53* presente era selvagem. Essa diferença não foi observada nos casos com *TP53* mutante. Sendo assim, o status mutacional do *TP53* parece desempenhar um papel importante na determinação da expressão de *TDG* em CEE primários, mas uma análise em uma maior quantidade de amostras é necessária para comprovarmos esta observação.

Uma das observações que levaram a realização deste estudo foi uma característica específica das áreas de alta incidência de câncer de esôfago: elevada proporção de duplas mutações no gene *TP53*, sendo, ao menos uma delas, uma

transição de G para A em sítios CpG (SEPEHR, A. *et al*., 2001 e BIRAMIJAMAL, F. *et al*., 2001; PUTZ, A. *et al*., 2002). Além disto, as transições G para A em sítios CpG do gene *TP53* são freqüentemente encontradas em tumores originados de processos inflamatórios. No ADE, 45% das mutações encontradas em *TP53* são transições G para A em sítios CpG (MONTESANO, R. *et al*., 1996; 1998) e o carcinoma colorretal, também originado de processos inflamatórios, apresenta uma elevada proporção deste tipo de mutação em *TP53* (44,8%) (IARC *TP53* database). No CEE, a proporção de mutações em ilhotas CpG do gene *TP53* é de 19%, mas esse valor sobe para 40,6% nos tumores provenientes do Irã, sendo comparável à frequência encontrada em ADE (IARC *TP53* database).

A elevada taxa de transições G>A em ilhotas CpG do gene *TP53* em CEE pode ser causada pelo processo inflamatório decorrente da lesão térmica provocada pela ingestão de bebidas quentes nessas regiões. A injúria crônica térmica e/ ou mecânica representa um fator de risco para desenvolvimento do CEE uma vez que o consumo de bebidas em elevadas temperaturas é um hábito comum em praticamente todas as áreas de alta incidência dessa malignidade no mundo (CASTELLSAGUÉ, X. *et al*., 2000; SEPEHR, A. *et al*., 2001 e BIRAMIJAMAL, F. *et al*., 2001; LAMBERT, R. *et al*., 2004; WU, M. *et al*., 2009; AKHTAR, S.S., 2009; ISLAMI, F. *et al*., 2009). Porém, não se sabe como a inflamação causa esse tipo específico de mutação. Dessa forma, é possível sugerir que os processos inflamatórios podem levar à repressão do reparo de malpareamentos G•T, originando assim a transição G >A.

Conforme dito anteriormente, a alta proporção de duplas mutações em sítios CpG do gene *TP53* nos CEE provenientes das áreas de alta incidência indica que a atividade da via de reparo da TDG, responsável por corrigir os malpareamentos que precedem o surgimento dessas mutações, está prejudica. Assim, foi hipotetizado nesta tese que a primeira mutação em *TP53* reduz a atividade da via da TDG e possibilita o surgimento da segunda mutação. Essa hipótese é sustentada pelo conceito de *mutator phenotype*. Esse conceito, extensivamente abordado por Loeb e colaboradores (1999, 2000, 2001, 2003 e 2010), preconiza que uma mutação inicial em um gene envolvido na modulação de funções celulares cruciais, como o *TP53*, pode levar a alterações em genes que estão envolvidos com o controle da estabilidade genômica, como as enzimas de reparo de DNA, levando a uma cascata de mutações através do genoma. O desenvolvimento de um *mutator phenotype* é uma característica comum das células tumorais e parece desempenhar um papel importante na rápida resistência adquirida à quimioterapia. Além disso, pode explicar o elevado número de mutações encontradas nessas células quando comparado a uma célula sadia (LOEB, L. *et al*., 2003).

O *TP53* desempenha um papel essencial no controle da estabilidade gênomica (BYKOV V. J. *et al*., 2003). A atividade de p53 induz diversos mecanismos anti-câncer e está envolvida na apoptose, estabilidade genética e inibição da angiogênese. A p53 atua através de vários mecanismos tais como transcrição gênica, parada do ciclo celular, senescência e apoptose (READ, A. P. e STRACHAN, T. 1999), além disso, uma das principais vias pela qual a p53 gerencia a manutenção da estabilidade genômica é através da modulação das vias de reparo de DNA (HUSSAIN, S. P. e HARRIS, C.C., 2006). Neste trabalho, foi demonstrado que a p53 regula transcricionalmente o gene *TDG*, confirmando a hipótese de que a primeira mutação em *TP53* reduz a atividade de TDG, possibilitando o surgimento da segunda mutação G para A em CpG . Além disso, em análises feitas durante este estudo utilizando dados da *TP53 database* (IARC, OMS), foi observado uma freqüência de 13% de transições G para A em sítios CpG, dentre as mutações descritas para os 1798 tumores de esôfago desse banco de dados que apresentavam somente uma mutação em *TP53*. Essa proporção subiu para 25% quando foram avaliados apenas os tumores de esôfago que apresentavam duplas mutações, sendo uma em sítio CpG. Esses dados indicam que ocorre um acúmulo de mutações G para A em sítios CpG do gene *TP53* com o aumento do número de mutações nos tumores. Isto reforça a hipótese de que a atividade da TDG é reduzida nos CEEs com mutação em *TP53*, podendo gerar um *mutator phenotype*.

Já foi descrito que a inativação mutacional de genes humanos envolvidos no reparo de malpareamentos como o *hMSH2*, *hMLH1* e *hPMS2* resultou em um *mutator phenotype* (PARSONS, R. *et al*., 1993 e BHATTACHARYYA, N. P. *et al*., 1994) e demonstrou-se que esse fenótipo está relacionado ao desenvolvimento de cânceres hereditários em diversos tecidos humanos (FISHEL, R. *et al*., 1993; LEACH, F. S. *et al*., 1993; BRONNER, C. E. *et al*., 1994; PAPADOPOULOS, N. *et al*., 1994 e NICOLAIDES, N. C. *et al*, 1994). Dessa forma, o conhecimento de como a atividade das vias de reparo de DNA é modulada por genes envolvidos no desenvolvimento de câncer pode ser muito útil no desenvolvimento de estratégias de tratamento para pacientes com câncer. A partir dos resultados gerados por essa tese, pode-se concluir que a p53 regula o reparo mediado pela TDG e que a inativação da p53 em células cancerosas pode contribuir para a aquisição de um *mutator phenotype* através da perda de função da TDG.

5. **CONCLUSÕES**

- Foi demonstrado neste trabalho que o gene *TDG* é regulado transcricionalmente pela proteína p53 e que sua expressão é induzida pelo dano ao DNA, de forma p53-dependente.

Essas conclusões foram baseadas nas seguintes observações:

- a expressão de *TDG* foi induzida pela proteína p53 ativa;

- a expressão de *TDG* foi induzida pelos tratamentos com MMS e doxorubicina em células apresentando p53 selvagem;

- a proteína p53 se ligou ao promotor de *TDG*, promovendo sua ativação;

- o silenciamento de *TDG* e subseqüente tratamento com MMS resultou na diminuição da proliferação celular e redução global do número de células nas diferentes fases do ciclo celular em células p53 competentes;

- CEE apresentando mutações em *TP53* apresentaram níveis de expressão de RNAm de *TDG* RNAm mais baixos do que os tumores que conservaram o gene selvagem.

REFERÊNCIAS

- ABU, M. e WATERS, T.R. The main role of human thymine-DNA glycosylase is removal of thymine produced by deamination of 5-methylcytosine and not removal of ethenocytosine. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8739 – 8744, 2003.

- ACHANTA, G. e HUANG, P. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. **Cancer Res.**, v. 64, n. 17, p. 6233-6239, 2004.

- ADIMOOLAM, S. e FORD, J.M. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. **DNA Repair.**, v. 2, n. 9, p. 947-954, 2003.

- AKHTAR, S.S. Tea and cancer. Role of temperature. **BMJ.**, v. 29, n. 338, p.1738 - 1745, 2009.

- ARAVIND, L. e KOONIN, E.V. The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. **Genome Biol.,** vol. 1, n. 4, p. 336 – 342, 2000.

- BAKKENIST, C.J. e KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature.**, v. 421, n. 6922, p. 499-506, 2003.

- BARNAS, C.; MARTEL-PLANCHE, G.; FURUKAWA, Y.; HOLLSTEIN, M.; MONTESANO, R. E HAINAUT, P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. **Int J Cancer.**, v. 71, n.1, p.79-87,1997.

- BARNES, D. e LINDAHL, T. DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. **Annu Rev Genet**, v. 38, p. 445-476, 2004.

- BHATTACHARYYA, N. P.; SKANDALIS, A.; GANESH, A.; GRODEN, J.; MEUTH, M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci,** v. 91, n.14, p.6319-6323, 1994.

- BENNETT, W.P.; VON BREVERN, M.C.; ZHU, S.M.; BARTSCH, H.; MUEHLBAUER, K.R.; HOLLSTEIN, M. C. p53 mutations in esophageal tumors from a high incidence area of China in relation to patient diet and smoking history. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 6, n. 11, p. 963-966, 1997.

- BENOIT, V. ; DE MORAES, E. ; DAR, N.A. ; TARANCHON, E. ; BOURS, V. ; HAUTEFEUILLE , A. ; TANIERE, P. ; CHARIOT, A. ; SCOAZEC, J.Y. ; DE MOURA GALLO, C.V. ;, MERVILLE, M.P. ; HAINAUT, P. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappaB. **Oncogene.**, v. 25, n. 42, p. 5708-5718, 2006.

- BIRAMIJAMAL, F.; ALLAMEH, A.; MIRBOD, P.; GROENE, H.J.; KOOMAGI, R.; HOLLSTEIN, M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. **Cancer Res.**, v. 61, n. 7, p. 3119-3123, 2001.

- Blizard Institute of Cell and Molecular Science, Flow Cytometry Core Facility, Disponível em: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry>. Acesso em: 09 de janeiro de 2011.

- BLOT, W.J. e MCLAUGHLIN, J.K. The changing epidemiology of esophageal cancer .**Semin Oncol**, v. 26, n. 5, p. 2-8, 1999.

- BOCANGEL D.; SENGUPTA S.; MITRA S.; BHAKAT K.K. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 10, p.3741-3750, 2009.

- BODE, M.A. e DONG, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. **Nature**, vol. 4, p. 793-805, 2004.

- BRANZEI, D. e FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 9, n. 4, p. 297-308, 2008.

- BRONNER, C.E.; BAKER, S.M.; MORRISON, P.T.; WARREN, G.; SMITH, L.G.; LESCOE, M.K.; KANE, M.; EARABINO, C.; LIPFORD, J.; LINDBLOM, A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature,** v. 368, n. 6468, p. 258-261, 1994.

- BYKOV, V.J.; SELIVANOVA, G.; WIMAN, K.G. Small molecules that reactivate mutant p53. **Eur J Cancer,** v. 39, n. 13, p.1828-1834, 2003.

- CADET, J.; BOURDAT, A.G.; D'HAM, C.; DUARTE, V.; GASPARUTTO, D. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzyme. **Mut Res**, v. 462, p.121-128, 2000.

- CASTELLSAGUÉ, X.; MUNOZ, N.; DE STEFANI, E.; VICTORA, C.G.; CASTELLETTO, R.; ROLON, P.A.; QUINTANA, M.J. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. **Int J Cancer**, v.82, n.5, p.657-664, 1999.

- CASTELLSAGUÉ, X.; MUNOZ, N.; DE STEFANI, E.; VICTORA, C.G.; CASTELLETTO, R.; ROLON, P.A.; QUINTANA, M.J. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **Int. J. Cancer**, v. 88, p. 658-664, 2000.

- CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; OSADA, M.; UPADHYAY, S.; SIDRANSKY, D. The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1) activity. **FASEB J.**, v. 20, n. 1, p. 112-114, 2005.

- CHAO, D.L.; SANCHEZ, C.A.; GALIPEAU, P.C.; BLOUNT, P.L.; PAULSON, T.G.; COWAN, D.S.; AYUB, K.; ODZE, R.D.; RABINOVITCH, P.S.; REID, B.J.. Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer outcome in patients with Barrett's esophagus: a long-term prospective study. **Clin Cancer Res,** v. 14, n. 21, p. 6988-6995, 2008.

- CHEN, D.; LUCEY, M.J.; PHOENIX, F.; LOPEZ-GARCIA, J.; HART, S.M.; LOSSON, R.; BULUWELA, L.; COOMBES, R.C.; CHAMBON, P.; SCHÄR, P.; ALI, S. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase potentiates transcription of estrogen-regulated genes through direct interaction with estrogen receptor alpha. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38586 - 38592, 2003.

- CHEVRAY, P.M. e NATHANS, D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. **Proc Natl Acad Sci,** v. 89, n. 13, p. 5789-93, 1992.

- COHEN, D.J. e AJANI, J. An expert opinion on esophageal cancer therapy. **Expert Opin Pharmacother.**, v. 12, n. 2, p. 225-239, 2011.

- CORTÁZAR, D.; KUNZ, C.; SAITO, Y.; STEINACHER, R.; SCHÄR, P. The enigmatic thymine DNA glycosylase. **DNA Repair**, v.6, n.4, p.489-504, 2007.

- CORTES, U.; MOYRET-LALLE, C.; FALETTE, N.; DURIEZ, C.; GHISSASSI, F.E.; BARNAS, C.; MOREL, A.P.; HAINAUT, P.; MAGAUD, J.P.; PUISIEUX, A. BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. **Mol Carcinog.**, v. 27, n. 2, p.57-64, 2007.

- COSTA, R.M.A. e MENCK, C.F.M. Genes de reparo de DNA In: Oncologia Molecular, Ed. Carlos Gil Ferreira, José Cláudio Rocha. 1 ed. Ateneu 465 pags, 2004.

- CRADDOCK, C. Head and neck cancer prevention: the new challenge. **Semin Oncol Nurs**, v.9, n.3, p.169-173, 1993.

- D'ANDREA, A.D. Targeting DNA repair pathways in AML. **Best Pract Res Clin Haematol.** v. 23, n. 4, p. 469-473, 2010.

- DENT, J. Barrett's esophagus: A historical perspective, an update on core practicalities and predictions on future evolutions of management. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 26, n. 1, p.11-30, 2011.

- EVANS, M.K.; TAFFE, B.G.; HARRIS, C.C.; BOHR, V.A. DNA strand bias in the repair of the p53 gene in normal human and xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. **Cancer Res,** v. 53, n. 22, p.5377- 5381, 1993.

- FELLER, L.; WOOD, N.H.; MOTSWALEDI, M.H.; KHAMMISSA, R.A.; MEYER, M.; LEMMER, J. Xeroderma pigmentosum: a case report and review of the literature. **J Prev Med Hyg.**, v. 51, n. 2, p. 87-91, 2010.

- FISHEL, R.; LESCOE, M.K.; RAO, M.R.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; GARBER, J.; KANE, M.; KOLODNER, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell.**, v. 75, n. 5, p.1027-1038, 1993.

- FRIEDBERG, E.C. Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. **Trends Biochem Sci.**, v. 20, n. 10, p. 381 - 389, 1995.

- GALLINARI, P. e JIRICNY, J. A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. **Nature**, v. 383, n. 6602, p. 735 - 738, 1996.

- GILL, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? **Genes Dev,** v. 18, n. 17, p. 2046-2059, 2004.

- Organização Mundial de Saúde, IARC, GLOBOCAN 2008. http://globocan.iarc.fr/. Acesso em: 02 de fevereiro de 2011.

- Genomatix, http://www.genomatix.de. Acesso em: 13 de janeiro de 2011.

- GREENBLATT, M.S.; CHAPPUIS, P.O.; BOND, J.P.; HAMEL, N.E FOULKES, W.D. *TP53* mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. **Cancer Res.**, v. 61, n. 10, p. 4092-4097, 2001.

- GUIMARÃES, D. P. e HAINAUT, P. *TP53*: a key gene in human cancer. **Biochimie**, v. 84, p. 83-93, 2002.

- GUIMARÃES, D.P.; OLIVEIRA, I.M.; DE MORAES, E.; PAIVA, G.R.; SOUZA, D.M.; BARNAS, C.; OLMEDO, D.B.; PINTO, C.E.; FARIA, P.A.; DE MOURA GALLO, C.V.; SMALL, I.A.; FERREIRA, C.G.; HAINAUT, P. Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. **Int J Cancer.**, v. 124, n. 2, p. 272-279, 2009.

- HAINAUT, P.; HERNANDEZ, T.; ROBINSON, A.; RODRIGUEZ-TOME, P.; FLORES, T.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. e MONTESANO, R. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n.1, p. 205-213, 1998.

- HANAWALT, P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. **Oncogene.** v. 21, n.58, p. 8949-8956, 2002.

- HARDELAND, U.; BENTELE, M.; JIRICNY, J.; SCHÄR, P.J. Separating substrate recognition from base hydrolysis in human thymine DNA glycosylase by mutational analysis. **Biol Chem**. v. 275, n.43, p.33449-33456, 2000.

- HARDELAND, U.; STEINACHER, R.; JIRICNY, J.; SCHÄR, P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. **The EMBO Journal**, v.21, n.6, p.1456 - 1464, 2002.

- HARDELAND, U; BENTELE, M.; JIRICNY, J.; SCHÄR, P. The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. **Nucleic Acids Research**, v.31, n. 9, p. 2261-2271, 2003.

- HAY, R. T. SUMO: a history of modification. **Mol Cell,** v. 18, n. 1, p. 1-12, 2005.

- HEATH, E.L.; LIMBURG, P.J.; HAWK, E.T.; FORASTIERE, A.A. Adenocarcinoma of the esophagus: risk factors and prevention. **Oncology**, v. 14, n. 4, p. 507-514, 2000.

- HENDRICH, B.; HARDELAND, U.; NG, H. H.; JIRICNY, J.; BIRD A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. **Nature.**, v. 401, n. 6750, p. 301-304, 1999.

- HOEIJMAKERS, H.J.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v.411, p.366-374, 2001.

- HOLLIDAY, R. e GRIGG, G.W. DNA methylation and mutation. **Mutat Res**, v. 285, n. 1, p. 61-67, 1993.

- HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C.C. p53 mutations in human cancers. **Science.**, v. 253, n.5015, p. 49-53, 1991.

- HONGO M.; NAGASAKI, Y.; SHOJI, T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. **J Gastroenterol Hepatol.,** v. 24, n. 5, p. 729-35, 2009.

- HUSSAIN, S.P. e HARRIS, C.C. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **J. Nipon Med Sch**, v. 73, p. 54-64, 2006.

- ISLAMI, F.; REN, J.S.; TAYLOR, P.R.; KAMANGAR, F. (2009). Pickled vegetables and the risk of oesophageal cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer.**, v. 101, n. 9, p.1641-1647.

- JAYARAMAN, L.; MURTHY, K. G.; ZHU, C.; CURRAN, T.; XANTHOUDAKIS, S.; PRIVES, C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. **Genes Dev.**, v. 11, n. 5, p. 558-570, 1997.

- JOST, J.P.; THIRY, S.; SIEGMANN, M. Estradiol receptor potentiates, in vitro, the activity of 5-methylcytosine DNA glycosylase. **FEBS Lett.**, v. 527, n.1-3, p. 63-66, 2002.

- KIM, E.J. e UM, S.J. Thymine-DNA glycosylase interacts with and functions as a coactivator of p53 family proteins. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 377, n. 3, p. 838-842, 2008.

- KIM, H.; PARK, J.; JUNG, Y.; SONG, S.H.; HAN, S.W.; OH, D.Y.; IM, S.A., BANG, Y.J.; KIM, T.Y. DNA methyltransferase 3-like affects promoter methylation of thymine DNA glycosylase independently of DNMT1 and DNMT3B in cancer cells. **Int J Oncol.**, v. 36, n. 6, p.1563-1572, 2010.

- KRAWCZAK, M.; BALL, E.V.; COOPER, D. N. Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. **Am J Hum Genet.**, v. 63, n. 2, p. 474-488, 1998.

- KUMAR, S. e SUBRAMANIAN, S. Mutation rates in mammalian genomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 2, p. 803-808, 2002.

- KUWANO, H.; KATO, H.; MIYAZAKI, T.; FUKUCHI, M.; MASUDA, N.; NAKAJIMA, M.; FUKAI, Y.; SOHDA, M.; KIMURA, H.; FARIED, A. Genetic alterations in esophageal cancer. **Surg Today**, v.35, n.1, p. 7-18, 2005.

- LAMBERT, R.; HAINAUT, P.; PARKIN, D.M. Premalignant lesions of the esophagogastric mucosa. **Semin Oncol**, v. 31, n. 4, p.498-512, 2004.

- LEACH, F.S.; NICOLAIDES, N.C.; PAPADOPOULOS, N.; LIU, B.; JEN, J.; PARSONS, R.; PELTOMÄKI, P.; SISTONEN, P.; AALTONEN, L.A.; NYSTRÖM-LAHTI, M. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell**, v. 75, n. 6, p.1215-1225, 1993.

- LEE, M.R.; KIM, S.H.; CHO, H.J.; LEE, K.Y.; MOON, A.R.; JEONG, H.G.; LEE, J. S.; HYUN, J.W.; CHUNG, M.H.; YOU, H.J. Transcription factors NF-YA regulate the

induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p.9857-9866, 2004.

- LINDAHL, T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. **Mutat Res**, v. 462, n. 2-3, p.129 -135, 2000.

- LIVNEH, Z.. DNA damage control by novel DNA polymerases: translesion replication and mutagenesis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 28, p. 25639-25642, 2001.

- LOEB, K.R. e LOEB, L.A. Genetic instability and the mutator phenotype. **American Journal of Pathology**, v.154, n.6, p.1621 – 1626, 1999.

- LOEB, K.R. e LOEB, L.A. Significance of multiples mutations in cancer. **Carcinogenesis**. v.21, n.3, p.379 - 385, 2000.

- LOEB, L.A. A mutator phenotype in cancer. Cancer Research. v.61, p.3230 - 3239, 2001.

- LOEB, L.A.; LOEB, K.R.; ANDERSON, J.P. Multiple mutations and cancer. **PNAS**, v.100, p.776-781, 2003.

- LOEB, L.A. Mutator phenotype in Cancer: Origin and Consequences. **Seminars in Cancer Biology**, Epub ahead of print, 2010.

- LODISH, H.F. Molecular cell biology. 5th ed., New York: W.H. Freeman and Company. xxxiii, 973 p, 2003.

- LU, C. e EL-DEIRY, W.S.. Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 597-606, 2009.

- LUCEY, M.J.; CHEN, D.; LOPEZ-GARCIA, J.; HART, S.M.; PHOENIX, F.; AL-JEHANI, R.; ALAO, J.P.; WHITE, R.; KINDLE, K.B.; LOSSON, R.; CHAMBON, P.; PARKER, M.G.; SCHÄR, P.; HEERY, D.M.; BULUWELA, L.; ALI, S. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase (TDG) as a coregulator of transcription interacts with SRC1 family members through a novel tyrosine repeat motif. **Nucleic Acids Res**, vol. 33, n.19, p. 6393-6404, 2005.

- MANDARD, A.M.; HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mutat Res**, v. 462, n. 2-3, p. 335-42, 2000.

- MILLAR, C.B.; GUY, J.; SANSOM, O.J.; SELFRIDGE, J.; MACDOUGALL, E.; HENDRICH, B.; KEIGHTLEY, P.D.; BISHOP, S.M.; CLARKE, A.R.; BIRD, A. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 403-405, 2002.

- Ministério da Saúde. Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer. MS/INCA, Brasil, http://www.inca.gov.br. Acesso em: 03 de fevereiro de 2011.

- MINTY, A.; DUMONT, X.; KAGHAD, M.; CAPUT, D. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p.36316-36323, 2000.

- MISSERO, C.; PIRRO, M.T.; SIMEONE, S.; PISCHETOLA, M.; DI LAURO, R. The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 33569-33575, 2001.

- MOHAN, R.D.; RAO, A.; GAGLIARDI, J.; TINI, M. SUMO-1-dependent allosteric regulation of thymine DNA glycosylase alters subnuclear localization and CBP/p300 recruitment. **Mol Cell Biol,** v. 27, n. 1, p.229-243, 2007.

- MONTESANO, R.; HOLLSTEIN, M. ; HAINAUT, P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **Int J Cancer**, v. 69, n.3, p.225-235, 1996.

- MONTESANO, R. e HAINAUT, P. Molecular precursor lesions in oesophageal cancer. **Cancer Surv**, v. 32, p. 53-68, 1998.

- MORITA, S.; YANO, M.; SHIOZAKI, H.; TSUJINAKA, T.; EBISUI, C.; MORIMOTO, T.; KISHIBUTI, M.; FUJITA, J.; OGAWA, A.; TANIGUCHI, M.; INOUE, M.; TAMURA, S.; YAMAZAKI, K.; KIKKAWA, N.; MIZUNOYA, S.; MONDEN M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. **Int J Cancer**, v. 71, n. 2, p.192 - 195, 1997.

- NEDDERMANN, P. e JIRICNY, J. The purification of a mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.21218 – 21224, 1993.

- NEDDERMANN, P; GALLINARY, P.; LETTIERI, T.; SCHIMID, D.; TRUONG, O.; HSUAN, J.; WIEBAUER, K.; JIRICNY, J. Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.12767 – 12774, 1996.

- NICOLAIDES, N.C.; PAPADOPOULOS, N.; LIU, B.; WEI, Y.F.; CARTER, K.C.; RUBEN, S. M.; ROSEN, C.A.; HASELTINE, W.A.; FLEISCHMANN, R.D.; FRASER, C.M. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature**, v. 71, n. 6492, p.75-80, 1994.

- NIEDERREITHER, K.; HARBERS, M.; CHAMBON, P.; DOLLÉ P. Expression of T:G mismatch-specific thymidine-DNA glycosylase and DNA methyl transferase genes during development and tumorigenesis. **Oncogene**, v. 17, n. 12, p. 1577-1585, 1998.

- NIMURA, Y.; YOKOYAMA, S.; FUJIMORI, M.; AOKI, T.; ADACHI, W.; NASU, T.; HE, M.; PING, Y. M.; IIDA, F. Genotyping of the CYP1A1 and GSTM1 genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking. **Cancer**, v. 80, n. 5, p. 852-857, 1997.

- O'NEILL, R.J.; VOROB'EVA, O.V.; SHAHBAKHTI, H.; ZMUDA, E.; BHAGWAT, A.S.; BALDWIN, G.S. Mismatch uracil glycosylase from Escherichia coli: a general mismatch or a specific DNA glycosylase? **J Biol Chem,** v. 278, n. 23, p. 20526 - 20532, 2003.

- Organização Mundial de Saúde, IARC, IARC *TP53* database, http://www-p53.iarc.fr/. Acesso em: 30 de janeiro de 2011.

- OFFER, H.; WOLKOWICZ, R.; MATAS, D.; BLUMENSTEIN, S.; LIVNEH, Z.; ROTTER, V. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. **FEBS Lett**, v. 450, n.3, p.197-204, 1999.

- PAPADOPOULOS, N.; NICOLAIDES, N.C.; WEI, Y.F.; RUBEN, S.M.; CARTER, K.C.; ROSEN, C.A.; HASELTINE, W.A.; FLEISCHMANN, R.D.; FRASER, C.M.; ADAMS, M.D. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v. 263, n. 5153, p.1625-1629, 1994.

- PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **International Journal of Cancer**, v. 94, n.2, p. 153-156, 2001.

- PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n.2, p. 74-108, 2005.

- PARSONS, R.; LI, G.M.; LONGLEY, M.J.; FANG, W.H.; PAPADOPOULOS, N.; JEN, J.; DE LA CHAPELLE, A.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; MODRICH, P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1227-1236, 1993.

- PENG, B.; HURT, E.M.; HODGE, D.R.; THOMAS, S.B.; FARRAR, W.L. DNA hypermethylation and partial gene silencing of human thymine- DNA glycosylase in multiple myeloma cell lines. **Epigenetics**, v. 1, n. 3, p.138-145, 2006.

- POHL, H. e WELCH, H.G. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, p.142-146, 2005.

- POIRIER, M.C. e WESTON, A. DNA Damage, DNA repair and mutagenesis. In: Bertino J, editor. Encyclopedia of cancer. Vol 2. 2nd ed. San Diego: Elsevier Science; p. 641–649, 2002.

- PÜTZ, A.; HARTMANN, A.A.; FONTES, P.R.; ALEXANDRE, C.O.; SILVEIRA, D.A.; KLUG, S.J.; RABES, H.M. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors. **Int J Cancer**, v. 98, n. 1, p. 99-105, 2002.

- RACHEK, L.I.; GRISHKO, V.I.; MUSIYENKO, S.I.; KELLEY, M.R.; LEDOUX, S.P.; WILSON, G.L. Conditional targeting of the DNA repair enzyme hOGG1 into mitochondria. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 44932-44937, 2002.

- READ, A.P. e STRACHAN, T. "Chapter 18: Cancer Genetics". Human molecular genetics 2. New York: Wiley, 1999.

- REYNOLDS, J.C.; WARONKER, M.; PACQUING, M.S.; YASSIN, R.R. Barrett's esophagus. Reducing the risk of progression to adenocarcinoma. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 28, n. 4, p. 917-945, 1999.

- ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.; SOARES LIMA, S.C.; GUIMARÃES, D.P.; FERREIRA, M.A.; TEIXEIRA, R.; KRUEL, C.D.; BARROS, S.G.; ANDREOLLO, N.A.; ACATAUASSÚ, R.; MATOS, H.J.; ALBANO, R.M.; RIBEIRO PINTO, L.F. Polymorphisms of GSTP1 and GSTT1, but not of CYP2A6, CYP2E1 or GSTM1, modify the risk for esophageal cancer in a western population. **Carcinogenesis**, v. 28, n.12, p. 2537 – 2542, 2007.

- ROTH, M.J.; DAWSEY, S.M.; WANG, G.; TANGREA, J.A.; ZHOU, B.; RATNASINGHE , D.; WOODSON, K.G.; OLIVERO, O.A.; POIRIER, M.C.; FRYE, B.L.; TAYLOR, P.R.; WESTON, A. Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. **Cancer Lett**, v. 156, n. 1, p. 73-81, 2000.

- ROUSE, J. & JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science,** v. 297, n. 5581, p.547-551, 2002.

- SARD, L.; TORNIELLI, S.; GALLINARI, P.; MINOLETTI, F.; JIRICNY, J.; LETTIERI, T.; PIEROTTI, M. A.; SOZZI, G.; RADICE, P. Chromosomal localizations and molecular analysis of TDG gene-related sequences. **Genomics**, v. 44, n. 2, p.222 - 226, 1997.

- SHAHEEN, N.J. e RICHTER, J.E. Barrett's oesophagus. **The Lancet**, v. 373, n. 9866, p. 850 – 861, 2009.

- SCHÄRER, O.D. e JIRICNY, J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. **Bioessays**, v. 23, n. 3, p. 270-281, 2001.

- SCHERER, S.J.; WELTER, C.; ZANG, K.D.; DOOLEY, S. Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 221, n. 3, p.722-728, 1996.

- SCHERER, S.J.; MAIER, S.M.; SEIFERT, M.; HANSELMANN, R.G.; ZANG, K.D.; MULLER-HERMELINK, H.K.; ANGEL, P.; WELTER, C.; SCHARTL, M. (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. **J Biol Chem,** v. 275, n. 48, p. 37469-37473.

- SCHMUTTE, C.; BAFFA, R.; VERONESE, L. M.; MURAKUMO, Y.; FISHEL, R. Human thymine-DNA glycosylase maps at chromosome 12q22-q24.1: a region of high loss of heterozygosity in gastric cancer. **Cancer Res**, v. 57, n. 14, p. 3010 – 3015, 1997.

- SEPEHR, A.; TANIÈRE, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; ZIA'EE, A.A.; RASTGAR-JAZII, F.; YAZDANBOD, M.; ETEMAD-MOGHADAM, G.; KAMANGAR, F.; SAIDI, F.; HAINAUT, P. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p.7368-7374, 2001.

- SENGUPTA, S. e HARRIS, C.C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2005.

- SEO, Y.R.; FISHEL, M.L.; AMUNDSON, S.; KELLEY, M.R.E; SMITH, M.L. Implication of p53 in base excision repair: in vivo evidence. **Oncogene**, v.21, p.731-737, 2002.

- SEO, Y.R. e JUNG, H.J. The potential roles of p53 tumor supressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). **Experimental and Molecular Medicine**, v. 36, n.6, p. 505-509, 2004.

- SHAHEEN, N.J. e RICHTER, J.E. Barrett's oesophagus. **Lancet**, v. 373, n. 9666, p. 850-861, 2009.

- SHARMA, P. Clinical practice. Barrett's esophagus. **N Engl J Med**, v. 361, n. 26, p. 2548-2556, 2009.

- SMITH, M.L. e SEO, Y.R. p53 regulation of DNA excison repair pathways. **Mutagenesis**, v. 17, n.2, p. 149-156, 2002.

- SOUZA-PINTO, N.C.; HARRIS, C.C.; BOHR, V.A. p53 functions in the incorporation step in base excision repair in mouse liver mitochondria. **Oncogene**, v. 23, p. 6559-6568, 2004.

- SPECHLER, S.J.; FITZGERALD, R.C.; PRASAD, G.A.; WANG, K.K. History, molecular mechanisms, and endoscopic treatment of Barrett's esophagus. **Gastroenterology,** v. 138, n. 3, p. 854-869, 2010.

- STEINACHER, R. e SCHÄR, P. Functionality of human Thymine DNA Glycosylase Requires SUMO – regulated Changes in Protein Conformation. **Current Biology**, v.15, p.616 - 623, 2005.

- SU, H.L. e LI, S.S. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. **Gene**, v. 296, n. 1-2, p. 65-73, 2002.

- TAKAHASHI, H.; HATAKEYAMA, S.; SAITOH, H.; NAKAYAMA, K.I. Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. **J Biol Chem,** v. 280, n. 7, p. 5611-5621, 2005.

- TICHÝ, A.; VÁVROVÁ, J.; PEJCHAL, J.; REZÁCOVÁ, M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. **Acta Medica,** v. 53, n. 1, p. 13-17, 2010.

- TIKOO, S. e SENGUPTA, S. Time to bloom. **Genome Integr,** v. 1, n. 1, p. 14 - 20, 2010.

- TINI, M.; BENECKE, A.; UM, S.J.; TORCHIA, J.; EVANS, R.M.; CHAMBON, P. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. **Mol Cell,** v. 9, n. 2, p. 265 - 277, 2002.

- TOH, Y.; OKI, E.; OHGAKI, K.; SAKAMOTO, Y.; ITO, S.; EGASHIRA, A.; SAEKI, H.; KAKEJI, Y.; MORITA, M.; SAKAGUCHI, Y.; OKAMURA, T.; MAEHARA, Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. **Int J Clin Oncol**, v. 15, n. 2, p.135-144, 2010.

- TOMSO, D.J. e BELL, D.A. Sequence context at human single nucleotide polymorphisms: overrepresentation of CpG dinucleotide at polymorphic sites and suppression of variation in CpG islands. **J Mol Biol**, v. 327, n. 2, p. 303-308, 2003.

- UM, S.; HARBERS, M.; BENECKE, A.; PIERRAT, B.; LOSSON, R.; CHAMBON, P. Retinoic acids receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.20728 – 20736, 1998.

- VAN LIESHOUT, E.M.; VAN HAELST, U.J.; WOBBES, T.; PETERS, W.H. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferase alpha and pi in human esophageal squamous epithelium, Barrett's epithelium and carcinoma. **Jpn J Cancer Research**, v. 90, n.5, p.530 – 535, 1999.

- VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p.307-310, 2000.

- WANG, X.W.; YEH, H.; SCHAEFFER, L.; ROY, R.; MONCOLLIN, V.; EGLY, J.M.; WANG, Z.; FREIDBERG, E.C.; EVANS, M.K.; TAFFE, B.G. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. **Nat Genet**, v. 10, n. 2, p. 188-195, 1995.

- WARNICK, C.T.; DABBAS, B.; FORD, C.D.; STRAIT, K.A. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 27363-27370, 2001.

- WATERS, T.R. e SWANN, P.F. Kinetics of the action of Thymine-DNA glycosylase. **J Biol Chem**, v. 273, n.32, p. 20007 – 20014, 1998.

- WATERS, T.R. e SWANN, P.F. Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites. **Mutat Res**, v. 462, n. 2-3, p. 137 – 147, 2000.

- WATERS, T.R.; GALLINARI, P.; JIRICNY, J; SWANN, P.F. Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 1, p. 67 – 74, 1999.

- Web Promotor Scan Service, Center for Information Technology, National Institute of Health, http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/. Acesso em: 01 de fevereiro de 2011.

- WEI, M.X.; LIU, J.M.; GADAL, F.; YI, P.; LIU, J.; CREPIN, M. Sodium phenylacetate (NaPa) improves the TAM effect on glioblastoma experimental tumors by inducing cell growth arrest and apoptosis. **Anticancer Res**, v. 27, n.2, p. 953-958, 2007.

- Wong, E.; Yang, K.; Kuraguchi, M.; Werling, U.; Avdievich, E.; Fan, K.; Fazzari, M.; Jin, B.; Brown, A. M.; Lipkin, M.; Edelmann, W. Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. **Proc Natl Acad Sci,** v. 99, n. 23, p. 14937-14942, 2002.

- WU, M.; LIU, A.M.; KAMPMAN, E.; ZHANG, Z.F.; VAN'T VEER, P.; WU, D.L.; WANG, P.H.; YANG, J.; QIN, Y.; UM, L.N.; KOK, F.J.; ZHAO, J.K. Green tea drinking, high tea temperature and esophageal cancer in high- and low-risk areas of Jiangsu Province, China: a population-based case-control study. **Int J Cancer,** v. 124, n. 8, p.1907-1913, 2009.

- YATSUOKA, T.; FURUKAWA, T.; ABE, T.; YOKOYAMA, T.; SUNAMURA, M.; KOBARI, M.; MATSUNO, S.; HORII, A. Genomic analysis of the thymine-DNA glycosylase (TDG) gene on 12q22-q24.1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Int J Pancreatol**, v. 25, n. 2, p. 97-102, 1999.

- YU, Z.; CHEN, J.; FORD, B.N.; BRACKLEY, M.E.; GLICKMAN, B.W. Human DNA repair systems: an overview. **Environ Mol Mutagen,** v. 33, n. 1, p. 3-20, 1999.

- ZAKY, A.; BUSSO, C.; IZUMI, T.; CHATTOPADHYAY, R.; BASSIOUNY, A.; MITRA, S.; BHAKAT, K.K. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. **Nucleic Acids Res,** v. 36, n. 5, p.1555-1566, 2008.

- ZHOU, J.; AHN, J.; WILSON, S.H.E; PRIVES, C. A role for p53 in base excision repair. **The EMBO Journal**, v.20, n.4, p.914-923, 2001.

- ZURER, I.; HOFSETH, L.J.; COHEN, Y.; XU-WELLIVER, M.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C.; ROTTER, V. The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. **Carcinogenesis**, v. 25, n.1, p. 11-19, 2004.