

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAROLINA DOMENICHE ROMAGNA

**Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA
mitocondrial na morte celular induzida por
geradores de oxigênio singlete**

Versão Original da Dissertação Defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:
04/06/2012

CAROLINA DOMENICHE ROMAGNA

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na
morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto

São Paulo

2012

Carolina Domeniche Romagna

Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete

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

Aprovado em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Aos meus pais, Nelson e Suely, pelo apoio
incondicional, amor e carinho**

Agradecimentos

A cada etapa de nossas vidas que se encerra nos relembramos dos momentos que se passaram e nos trouxeram até aqui. Se estou aqui hoje é por que muitas pessoas me ajudaram e acreditaram em mim. A estas pessoas endereço esse texto.

Como é de costume, inicio com minha orientadora, Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto. Muito obrigada, Nadja, pelos experimentos e protocolos vistos e revistos, por entender os meus resultados mesmo não entendendo nada das minhas planilhas, por permitir que eu me perdesse nos meus dados e por, ainda assim, não me deixar sair do trilho. Enfim, obrigada pela orientação nesta jornada! E, mais que isso, obrigada pela amizade e pelo apoio nesses anos.

Agradeço à Profa. Dra. Alicia J. Kowaltowski por me acolher entre seus alunos e fornecer todo o apoio necessário para a realização desse trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Terêsa Miranda e ao Dr. Cleber Liria pela orientação e apoio durante minha Iniciação Científica.

Agradeço ao Dr. José Pedro Friedman Angeli pelo auxílio e participação nos experimentos de quantificação de oxigênio singlete.

Meus colegas de laboratório que, na verdade, são muito mais do que isso, fazem parte de cada palavra deste texto no auxílio nos experimentos, na análise deles e na manutenção da minha sanidade mental. Agradeço imensamente à Andressa Pereira, ao Mateus Mori, à Marlene Fortunato, ao Bruno Queliconi e ao Felipe Ravagnani pelo apoio e amizade.

Agradeço à minha grande amiga Luiza Marques por todas as revisões de texto (inclusive deste texto, até a madrugada), por todas as quebradas de galho, por ouvir todas as minhas lamúrias e pela amizade desde sempre.

Agradeço aos Professores Doutores Etelvino José Henriques Bechara, Anibal Vercesi, Paolo Di Mascio, Bettina Malnic, Maurício da Silva Baptista, Maria Julia Manso Alves, Mari Cleide Sogayar, Marisa Helena Gennari de Medeiros, Pio Colepicolo Neto, Glaucia Mendes Souza, Maria Terêsa Machini de Miranda, Déborah Schechtman, Ricardo José Giordano, Fabio Luis Forti, Sérgio Verjovski de

Almeida, Claudimir Lucio do Lago e Cassius Vinicius Stevani pelo acesso a recursos necessários para o trabalho que deu origem a essa dissertação.

Agradeço aos meus amigos na Tamoios Tecnologia e na Agencia Verde pela amizade neste último ano.

É difícil transpor para o papel o sentimento de gratidão pela presença de tantos amigos quanto os que tive nesta trajetória. Alguns estiveram sempre aqui, outros passaram, deixaram sua marca e tomaram outros rumos. Agradeço aos amigos Esther, Luis Felipe, Marcelo, Gustavo Ribeiro, Thiago, Raquel, Jaqueline, André, Fabíula, Gustavo Carvalho, Carol Parga, Renata, Rute, Dani, Jana, Gabi, Valquíria, Paulo, Camille, Fernanda Cunha, Graciele, Fernanda Cerqueira, Eric, Ariel, Bruno Chausse, Felipe Navarete, João Victor, Fabiana, Doris, Chrislaine, Rita, Adriano, Julio, Douglas, Maíra, Tiago, Julio, Carina, Matheus e aos demais representantes discentes da pós-graduação que, no laboratório ou em momentos de descontração, foram parte essencial dessa trajetória. Agradeço também às pessoas que nunca puseram os pés no IQ, mas que me ajudaram muito nesta trajetória: um agradecimento especial para meus primos, tios, avós, para a Eliane, para a Isaura e todas as clientes da minha mãe que de muitas maneiras me ajudaram!

E, como não poderia deixar de ser, agradeço à minha mãe e meu pai pelo apoio incondicional, pelas noites mal dormidas esperando eu voltar do IQ, pela liberdade que me deram de escolher meu caminho. Enfim, por tudo!

Por último, agradeço ao CNPq e à FAPESP pela bolsa de mestrado, pelos projetos de pesquisa do laboratório e pelo INCT em Processos Redox em Biomedicina. Não agradeço a essas instituições apenas por ser necessário, agradeço com toda a ênfase: sem elas não seria possível a execução do projeto que deu origem a essa dissertação.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

Resumo

Romagna, C.D. **Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete.** 2012, 100p., Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mitocôndrias desempenham um papel central na homeostase celular. Estas organelas se diferem das demais não só por suas múltiplas funções, mas por terem seu próprio genoma, distinto do genoma nuclear. Estas organelas também participam de mecanismos de morte celular de forma central nos três mecanismos mais conhecidos: apoptose, necrose e autofagia. O mtDNA está localizado na face interna da membrana mitocondrial, onde são geradas grandes quantidades de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Em consequência, o mtDNA acumula modificações oxidativas, mesmo em condições normais de metabolismo. Entretanto as respostas celulares ao acúmulo de lesões no mtDNA ainda não são claras. Para investigarmos se lesões oxidativas no mtDNA causam morte celular, propomos um modelo no qual oxigênio singlete é gerado especificamente na mitocôndria, pela ação de fotossensibilizadores com diferentes localizações celulares (azul de metileno, AM, e cristal violeta, CV, citosólicos; Ro 19-8022, Ro, citosólico e nuclear). Mostramos, por microscopia confocal, que os corantes tem a localização esperada em células HeLa. Além disso, observamos que o AM gera oxigênio singlete proporcionalmente a concentração do corante e dose de fotoativação. Mostramos que células tratadas com os corantes diminuem a velocidade de duplicação 24 h após o tratamento, que resulta em morte celular. Para AM e Ro, estes efeitos foram proporcionais à concentração de corante e da dose de fotoativação. Por outro lado, CV apresentou uma alta toxicidade mesmo no escuro. Mostramos que as células tratadas com AM não apresentam fragmentação internucleossômica de DNA, típica de apoptose após 24 h e não apresentam quebras de fita e formação de sítios abásicos logo após o tratamento. Finalmente mostramos que células com depleção do número de cópias de mtDNA são menos sensíveis ao tratamento com AM e igualmente sensíveis ao tratamento com Ro que células HeLa normais, indicando que lesões oxidativas ao mtDNA determinam a sensibilidade celular ao AM.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, estresse oxidativo, oxigênio singlete, morte celular, fotossensibilizadores

Abstract

Romagna, C.D. **Study of the role of oxidative damage to the mtDNA on the cell death induced by singlet oxygen generators.** 2012, 100p., Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mitochondria play a central role in cell homeostasis. They differ from other subcellular structures not only due to their many functions but also because they have their own genome. Moreover, mitochondria also play a central role in cell death, in apoptosis, necrosis as well as autophagy. The mitochondrial DNA sits at the inner side of the inner mitochondrial membrane, where most of reactive oxygen species are generated, and in fact, mtDNA accumulates oxidative damage under normal physiological conditions. However, cellular responses to mtDNA damage are not clearly understood. In order to ascertain whether mtDNA damage induces cell death, we established a cellular model in which oxidative stress is induced exclusively in mitochondria, by using two photosensitizers that localize in the cytosol (methylene blue, MB and crystal violet, CV) and comparing to another one with diffuse distribution (Ro 19-8022, Ro). These molecules generate singlet oxygen locally upon photoactivation. Using confocal fluorescence microscopy we confirmed the cellular localization of the dyes, and found that MB generates singlet oxygen in cells in a dose- and light-dependent fashion. Treatment with the dyes induced dose-dependent cell proliferation inhibition and cell death. The cytotoxic effects of MB and Ro were completely dependent on light-activation whereas CV induced cell death in the dark. We found that under these conditions, MB treatment did not induce internucleosomal DNA fragmentation or non-nucleosomal fragmentation, as we did not observe comet formation. These results indicate absence of nuclear DNA damage. On the other hand, cells depleted of mtDNA showed decreased sensitivity to MB but not to RO, indicating that mtDNA damage plays a key role in inducing cell death under these experimental conditions.

Keywords: mitochondrial DNA, oxidative stress, singlet oxygen, cell death, photosensitizers

Sumário

| | |
|--|-------------|
| AGRADECIMENTOS | IV |
| RESUMO | VI |
| ABSTRACT | VII |
| SUMÁRIO | VIII |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. A origem evolutiva das mitocôndrias e o DNA mitocondrial | 12 |
| 1.2. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo | 16 |
| 1.3. Lesões oxidativas em DNA | 21 |
| 1.3.1. Oxidação de bases nitrogenadas | 21 |
| 1.3.2. Oxidação do açúcar | 22 |
| 1.3.3. Modificações mutagênicas | 22 |
| 1.3.4. Modificações citotóxicas | 23 |
| 1.3.5. Modificações que impedem associações com proteínas | 24 |
| 1.4. Lesões ao mtDNA e a homeostase celular | 24 |
| 1.5. Integridade mitocondrial e o processo de morte celular | 26 |
| 1.6. Terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores e morte celular | 30 |
| 1.6.1. Azul de metileno | 33 |
| 1.6.2. Cristal Violeta | 33 |
| 1.6.3. Ro 19-8022 | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 3.1. Procedência dos reagentes, materiais e equipamentos usados | 36 |
| 3.2. Linhagens celulares e manutenção das culturas | 37 |
| 3.3. Preparo de soluções e tratamentos com corantes | 38 |
| 3.4. Absorção dos corantes | 40 |
| 3.5. Microscopia confocal | 40 |
| 3.6. Quantificação de oxigênio singlete | 42 |
| 3.6.1. Tratamento oxidativo das células na presença do captador de oxigênio singlete dietil 3,3'-(9,10-antraceno-diol)bisacrilato (DADB) | 42 |
| 3.6.2. Detecção e quantificação do endoperóxido dietil 3,3'-(9,10-antraceno-diol)bisacrilato (DADBO ₂) | 43 |
| 3.7. Medida de proliferação celular | 44 |
| 3.8. Medida de sobrevivência celular | 45 |
| 3.8.1. Baixa densidade celular | 45 |
| 3.8.2. Alta densidade celular | 45 |
| 3.8.3. Processamento das placas com colônias e cálculo de sobrevivência | 46 |
| 3.9. Ensaio cometa | 46 |
| 3.9.1. Soluções | 46 |
| 3.9.2. Preparação das lâminas | 47 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3.9.3. | Procedimento para o ensaio Cometa | 47 |
| 3.9.4. | Análise das lâminas geradas no ensaio cometa | 48 |
| 3.10. | Eletrforese em gel de agarose para detecção de fragmentação internucleossômica | 49 |
| 3.10.1. | Preparação das amostras | 49 |
| 3.10.2. | Isolamento de DNA por salting-out | 49 |
| 3.10.3. | Eletrforese em gel de agarose das amostras | 51 |
| 3.11. | Geração de clones HeLa $\rho^{-/0}$ | 51 |
| 3.12. | Quantificação de mtDNA e nDNA | 52 |
| 3.13. | Avaliação de sobrevivência de células $\rho^{-/0}$ | 53 |
| 4. | RESULTADOS | 54 |
| 4.1. | Captação, localização e fotoativação dos corantes | 54 |
| 4.1.1. | Captação | 55 |
| 4.1.2. | Localização | 57 |
| 4.1.3. | Geração de oxigênio singlete | 63 |
| 4.2. | Toxicidade | 65 |
| 4.2.1. | Proliferação | 66 |
| 4.2.2. | Sobrevivência | 69 |
| 4.2.3. | Ensaio do Cometa | 74 |
| 4.2.4. | Indução de apoptose pelos corantes | 76 |
| 4.3. | Estudo de clones HeLa ρ^{-} | 78 |
| 4.3.1. | q-PCR para quantificação de mtDNA | 79 |
| 4.3.2. | Sobrevivência de células ρ^{-} ao tratamento oxidativo | 80 |
| 5. | DISCUSSÃO | 83 |
| 6. | CONCLUSÕES | 90 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 92 |
| | LISTA DE ANEXOS | 100 |

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

1. Introdução

Mitocôndrias são organelas que estão presentes no citoplasma de quase todas as células eucarióticas, onde desempenham um papel central na manutenção da homeostase celular. Essas organelas são o principal sítio celular de produção de energia (na forma de ATP) através do processo de fosforilação oxidativa, no qual elétrons provenientes da oxidação de substratos energéticos (como carboidratos, lipídios e aminoácidos) são transportados através de 4 complexos protéicos (Complexos I-IV) embebidos na membrana mitocondrial interna, até reduzirem o oxigênio molecular (O_2) a água, no sítio ativo da enzima Citocromo C oxidase, ou complexo IV. Esse transporte de elétrons, no sentido crescente de E_0' , está acoplado ao bombeamento de prótons para o lado externo da membrana mitocondrial interna, gerando um gradiente de prótons, que é então utilizado para fosforilação de ADP a ATP. Além de seu papel direto no metabolismo energético celular, outras vias metabólicas importantes requerem atividades contidas dentro das mitocôndrias, como parte das reações do ciclo da ureia e das reações de síntese de grupamentos heme. As mitocôndrias também participam do controle da concentração intracelular de Ca^{2+} e de importantes vias de sinalização intracelular (1).

Dentre essas, destacamos as vias que levam à morte celular. Quando células eucarióticas são submetidas a situações de estresse severo, principalmente estresse genotóxico, em que a capacidade de reparo da célula é suplantada, pelo menos duas vias efetoras distintas que resultam na morte celular podem ser ativadas. Enquanto cada uma dessas vias utiliza estratégias moleculares diferentes, alterações mitocondriais são observadas, e desempenham um papel causal, em

Introdução

ambas, como será discutido adiante. Dessa forma, a integridade mitocondrial controla, em última instância, a sobrevivência celular (2).

A identificação das lesões e dos eventos moleculares responsáveis pela morte celular, seja em condições fisiológicas ou patológicas, representa um desafio importante para ciência biomédica atual. Como será discutido adiante, a morte celular, seja controlada ou não, desempenha um papel muito fundamental na homeostase tecidual em organismos multicelulares, com também implicações no desenvolvimento de doenças. O processo de formação de tumores, por exemplo, pode ser entendido como a perda da capacidade do organismo de eliminar uma determinada população celular que sofreu alterações em seu material genético. Por outro lado, os efeitos terapêuticos e colaterais de agentes quimioterápicos estão associados à sua toxicidade preferencial sobre determinados tecidos ou tipos celulares (3). Dessa forma, o melhor entendimento molecular desses processos pode contribuir para o desenvolvimento de práticas terapêuticas ou preventivas para uma série de condições, que incluem intoxicações e carcinogênese.

Neste trabalho, investigamos o papel da mitocôndria no mecanismo molecular de morte celular induzido por corantes fotossensíveis que geram oxigênio singlete quando fotoativados. Mais especificamente, investigamos se o DNA mitocondrial (mtDNA) representa um alvo preferencial durante a perda da integridade celular nessas condições. Alguns desses fotossensibilizadores têm sido avaliados recentemente para o uso em terapia fotodinâmica contra alguns tipos de tumores, e entender seu mecanismo de ação é um passo importante no avanço de seu uso clínico e no desenho de novas moléculas.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

1.1. A origem evolutiva das mitocôndrias e o DNA mitocondrial

Mitocôndrias se distinguem dos outros componentes intracelulares não apenas devido às suas várias funções, mas também ao fato de que elas contêm seu próprio genoma, distinto do genoma nuclear (4;5). A presença deste mtDNA é uma das mais fortes evidências da origem evolutiva procariótica das mitocôndrias, resultado de um evento simbiótico em que uma bactéria foi internalizada por um organismo pré-eucariótico, provavelmente um *Archea* anaeróbico (6). A alta homologia de sequência entre o genoma mitocondrial e α -protobactérias modernas, mais especificamente do gênero *Rickettsia*, sugere que a bactéria que deu origem às mitocôndrias era provavelmente um ancestral comum desse gênero, que já continha o aparato molecular de transporte de elétrons utilizando O_2 como aceptor final (7). Esse evento, que deve ter ocorrido entre 2,5 a 2 bilhões de anos atrás, coincide com o período de aumento da concentração de O_2 na atmosfera. O fato de que todos os organismos eucariotos conhecidos têm mitocôndrias, ou tiveram em algum momento de sua história evolutiva, atesta para o sucesso desse evento simbiótico e sua importância na evolução dos eucariotos. Acredita-se que esse sucesso evolutivo decorre não apenas do aumento da eficiência energética do novo organismo (uma vez que a oxidação completa de substratos através da fosforilação oxidativa gera muito mais ATP do que a degradação parcial pela glicólise), mas também da proteção conferida pelo endossimbionte aeróbico ao hospedeiro anaeróbico contra o estresse oxidativo crescente, imposto pelo aumento da concentração de O_2 na atmosfera (6).

Introdução

O genoma mitocondrial consiste de uma molécula de DNA circular, que em células humanas contém 16.568 pares de bases (www.mitomap.org). Em mamíferos, o mtDNA é extremamente denso em informação genética, com apenas algumas centenas de bases não-codificantes. No entanto, essas bases não-codificantes constituem uma sequência regulatória essencial para a replicação e transcrição do mtDNA, o D-loop, onde estão localizados a origem de replicação da fita H (do inglês *heavy*, ou pesada) e os promotores das fita H e L (do inglês *light*, ou leve), o que também as torna essenciais para a integridade do mtDNA.

O mtDNA humano codifica para 13 proteínas (subunidades de 4 dos 5 complexos da fosforilação oxidativa), 2 rRNAs e os 22 tRNAs necessários para síntese de proteínas na mitocôndria. O mtDNA humano foi o primeiro genoma a ser sequenciado por completo, em 1981 (8). A sequência foi revisada em 1999 (9) e foram encontrados 8 erros de sequência e 10 polimorfismos raros. A Figura 1-1 apresenta o mapa anotado do genoma mitocondrial humano, indicando as posições dos 13 genes protéicos (roxo), dos 2 rRNAs (verde claro), dos 22 tRNAs (verde escuro) e o D-Loop (cinza). A alta densidade informacional implica que alterações químicas (lesões) ou mutações em qualquer nucleotídeo do mtDNA têm grandes chances de resultarem em alterações funcionais.

**Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete**

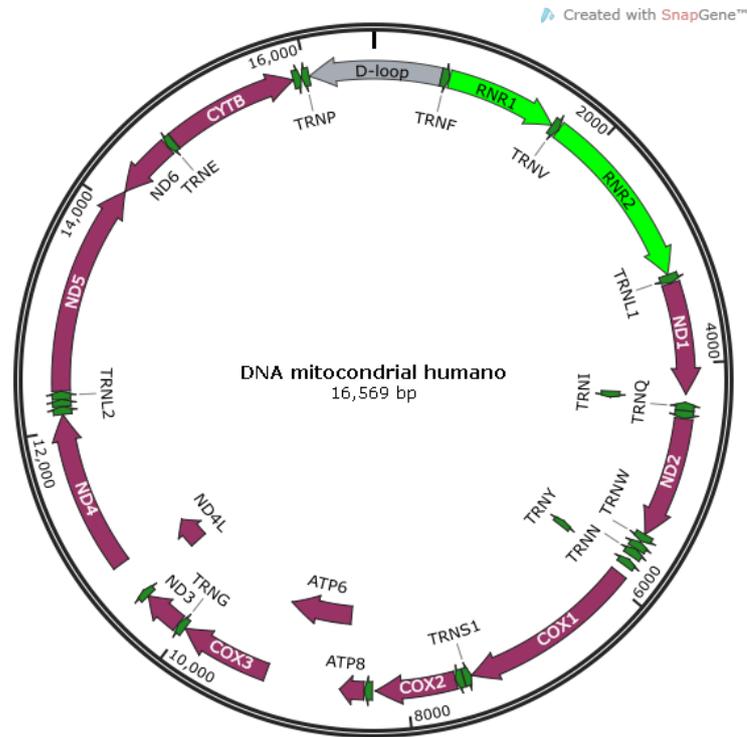


Figura 1-1. Mapa anotado do genoma mitocondrial humano, indicando as posições dos genes proteicos (roxo), dos 2 rRNAs (verde claro), 22 tRNAs (verde escuro) e o D-Loop (cinza). Os 13 polipeptídeos codificados no mtDNA são componentes dos complexos I, III e IV da cadeia transportadora de elétrons, e do complexo V, a ATP sintase. Figura gerada no *SnapGene Viewer* a partir da sequência NC_012920 do GenBank.

Todas as 13 subunidades codificadas no mtDNA são componentes centrais dos respectivos complexos, como pode ser visto na Figura 1-2, e são essenciais para a montagem e o funcionamento adequado dos complexos respiratórios. Por exemplo, o Complexo I (NADH-desidrogenase) é composto por 45 subunidades protéicas, das quais apenas 7 são codificadas no mtDNA. Mutações em 3 subunidades codificadas no mtDNA (ND1, ND4 e ND6) resultam em uma diminuição significativa dos níveis protéicos do complexo montado, enquanto mutações na subunidade ND2 (também codificada no mtDNA) resultam no acúmulo de intermediários incompletos de montagem (10).

Introdução

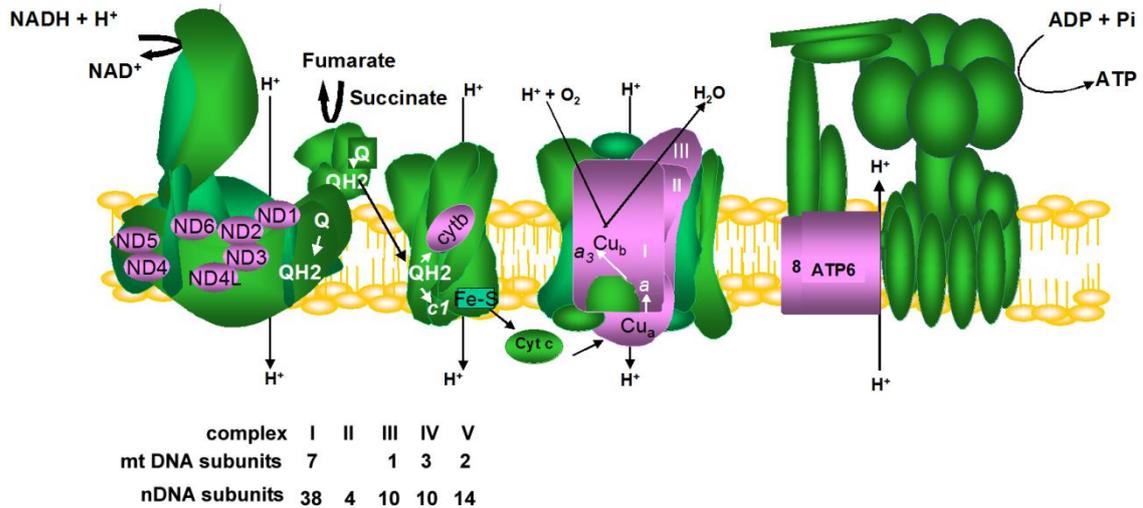


Figura 1-2. Localização dos polipeptídeos codificados pelo mtDNA nos complexos respiratórios I (NADH:Q oxidoreductase), III (Q:Citocromo c oxidoreductase), IV (Citocromo c oxidase) e V (ATP sintase). Os polipeptídeos de origem mitocondrial estão coloridos em rosa e os de origem nuclear estão coloridos em verde. Adaptado de Barros *et al.*, 2012, submetido (10).

O proteoma mitocondrial é composto por entre 800 e 1200 proteínas distintas, das quais apenas as 13 citadas acima são codificadas no mtDNA. Isso poderia significar que esse genoma fosse dispensável, e a perda funcional do mtDNA tivesse pouco impacto na função mitocondrial, e por consequência na homeostase celular. No entanto, muitas evidências experimentais indicam que a integridade do mtDNA é fundamental para a função mitocondrial, e a existência de doenças humanas que são causadas por mutações e/ou deleções no mtDNA provê a maior demonstração dessa relação causal (11).

Doenças mitocondriais compreendem uma ampla classe de doenças distintas, mas que apresentam sintomas comuns, como acidose láctica, cardiomiopatia e neuropatia (11). Os tecidos mais comumente afetados são a musculatura lisa e cardíaca, o nervo óptico e o sistema nervoso central. Hoje já são conhecidas mais de 200 mutações/deleções distintas que causam doenças mitocondriais (11). Além disso, recentemente defeitos na fosforilação oxidativa se transformaram no mais

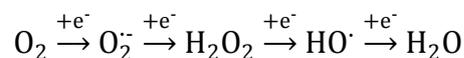
***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

comum tipo de erro inato de metabolismo (12), e estimativas recentes indicam que 1 em 5000 nascimentos irá apresentar uma mutação/deleção que cause um mau funcionamento da fosforilação oxidativa (13).

1.2. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O oxigênio molecular, em seu estado fundamental, encontra-se em uma configuração triplete, ou seja, apresenta dois elétrons desemparelhados nos dois orbitais moleculares degenerados de maior energia da molécula. Esta característica torna o O₂ paramagnético, o que lhe confere a capacidade de formar espécies radicalares e reagir diretamente com outras moléculas tripletes com energias de ativação baixas (14).

Em condições metabólicas normais, a mitocôndria é responsável pela maioria do consumo de O₂ de células eucarióticas. Durante a respiração O₂ é reduzido, pela transferência de 4 elétrons, a água no sítio catalítico do complexo IV, a enzima citocromo c oxidase, sem a liberação de intermediários de redução. Entretanto, mesmo em condições fisiológicas, há redução monoeletrônica do O₂ a ânion radical superóxido (O₂^{•-}) nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons. O O₂^{•-}, por sua vez, pode receber mais um elétron, em outro passo de redução monoeletrônica, gerando H₂O₂. Este peróxido pode também ser reduzido monoeletronicamente, o que leva a uma quebra da molécula produzindo radical hidroxila, HO[•] e ânion hidroxila, HO⁻, como demonstrado no esquema abaixo (14;15).



Esquema: passos de redução monoeletrônica do oxigênio molecular

Introdução

Esses intermediários de redução do O_2 são altamente reativos em sistemas biológicos, e em conjunto são denominados **Espécies Reativas de Oxigênio**, ou EROs (14).

Além destas EROs, oxigênio singlete (1O_2) também é uma espécie de importância biológica. Essa ERO pode ser gerada, por exemplo, por ação enzimática, ação direta de luz UVA, ou por moléculas excitadas na presença de oxigênio molecular. Foram identificadas duas espécies singlete excitadas do oxigênio molecular com dois elétrons nos orbitais π^* de menor energia: as espécies com notações espectroscópicas de simetria $^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$. A espécie $^1\Sigma_g^+$ não apresenta reatividade química conhecida com outras moléculas em solução, ao passo que a espécie $^1\Delta_g$ apresenta uma reatividade alta e, portanto, apresenta maior relevância para estudos em sistemas biológicos (16). Para simplificar, neste texto, oxigênio singlete e o símbolo 1O_2 fazem referência à espécie que tem notação $^1\Delta_g$. O 1O_2 é extremamente reativo e a sua velocidade de oxidação de moléculas vizinhas é da mesma ordem de grandeza da velocidade de difusão desta molécula em meio aquoso (16). O estudo dos efeitos biológicos do 1O_2 teve início cerca de 40 anos atrás, quando este foi identificado como efector da toxicidade de fotossensibilizadores (17), conforme será tratado com mais detalhes no item 1.6 deste texto.

A concentração de O_2 na atmosfera terrestre começou a aumentar, e atingir níveis importantes, somente há cerca de 2,5 bilhões de anos, com o aparecimento de bactérias fotossintetizantes. Com o aumento da concentração de O_2 , os organismos vivos passaram a enfrentar os efeitos deletérios de EROs, o que levou à evolução de vários mecanismos de defesa contra essas espécies e contra os efeitos

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

de sua ação sobre biomoléculas. Os mecanismos antioxidantes podem ser agrupados em 5 grandes classes, de acordo com suas características moleculares e modo de ação (14):

- a. Agentes que removem cataliticamente as espécies oxidantes como, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalases e peroxidases;
- b. Proteínas que diminuem a biodisponibilidade de moléculas que podem catalisar a geração de espécies oxidantes, como íons de ferro e cobre e o grupo heme; exemplos destes são transferrinas, metalotioneína e ceruloplasmina;
- c. Proteínas que protegem biomoléculas de dano por outros mecanismos, como por exemplo, *Heat Shock Proteins*, que promovem o enovelamento de outras proteínas e, portanto diminuem sua exposição ao solvente e às EROs;
- d. Moléculas de baixo peso molecular que agem como capturadoras de espécies reativas e as proteínas responsáveis por manter estas pequenas moléculas em seu estado reduzido, oxidado ou na proporção favorável; exemplos destas pequenas moléculas são o tripeptídeo glutathiona, α -tocoferol, ácido úrico e ácido ascórbico;
- e. Mecanismos de reparo de danos a biomoléculas, degradação de moléculas degradadas e morte celular. As vias moleculares envolvidas são extensas, e algumas delas serão discutidas adiante.

Introdução

O interesse pelo estudo do papel de EROs em sistemas biológicos iniciou-se com evidências de que essas espécies, e em particular o HO^{\cdot} , eram mediadoras dos efeitos tóxicos de radiações ionizantes (18). Entretanto, devido ao seu curto tempo de vida médio, a ocorrência dessas espécies em condições fisiológicas era bastante questionada. A descoberta da enzima superóxido dismutase, em 1969 por McCord e Fridovich (19), demonstrou que EROs deveriam desempenhar papéis biológicos relevantes e marcou o início da era da biologia redox. Em decorrência de sua alta reatividade com biomoléculas, inicialmente EROs eram vistas apenas como moléculas efetoras de processos deletérios, e foram associadas a muitos processos patológicos e degenerativos, como o envelhecimento (20). No entanto, hoje já é claro que EROs desempenham funções fisiológicas de sinalização, e estão envolvidas em processos celulares normais, como o controle da proliferação celular e expressão gênica (21-23).

Devido ao controle restrito da concentração intracelular de EROs por diversos mecanismos celulares, danos oxidativos a biomoléculas podem ocorrer quando há uma geração excessiva de EROs ou quando estes mecanismos são diminuídos. Portanto, quando há a ocorrência de um destes eventos, esse estado é chamado estresse oxidativo.

Em sistemas biológicos EROs podem ser produzidas por reações enzimáticas ou não enzimáticas (15). As fontes enzimáticas incluem várias oxidases, como as NADPH oxidases, a xantina oxidase, e as oxidases do sistema P450 (24-26). As fontes não enzimáticas incluem, principalmente, transferências de elétrons realizadas em sítios contendo metais de transição, como centros ferro-enxofre e grupamentos heme (15). A cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

representa um sítio muito importante para a geração de EROs em condições fisiológicas (15).

Em células de mamíferos, tanto o Complexo I quanto o Complexo III foram identificados como sítios de produção de $O_2^{\cdot-}$, com esta espécie sendo liberada tanto para a matriz mitocondrial quanto para o espaço intermembranas. No complexo III, coenzimas Q são oxidadas de modo que há formação de um intermediário semiquinona radical em dois sítios da molécula, um que fica voltado para a matriz mitocondrial (Q_n) e outro que fica voltado para o espaço intermembranas (Q_p). Os sítios Q_p e Q_n permitem que oxigênio molecular interaja com a semiquinona radical gerada, e seja reduzido a $O_2^{\cdot-}$. Os sítios de geração de $O_2^{\cdot-}$ no complexo I ainda não foram molecularmente descritos; no entanto, sabe-se que há pelo menos dois sítios de geração da ERO. O complexo II não está diretamente envolvido na geração de $O_2^{\cdot-}$, no entanto algumas evidências experimentais indicam que fluxo reverso de elétrons do complexo II para o complexo I pode aumentar a geração de $O_2^{\cdot-}$ em algumas condições. Este fluxo reverso é tão mais favorável quanto maior o potencial de membrana mitocondrial. Por isso, vários grupos propõem que vias desacopladoras (que diminuem o potencial de membrana) têm um papel importante no controle da geração mitocondrial de EROs (15).

EROs alteram biomoléculas através das reações químicas que realizam com estas. Como consequência, as biomoléculas oxidadas sofrem rearranjos intra- e intermoleculares que resultam na alteração de suas estruturas moleculares. As consequências funcionais dessas alterações são diversas, e incluem: a perda de função de proteínas e possível ganho de funções alternativas, a desestabilização de

Introdução

membranas quando há dano a lipídios, a quebra da cadeia açúcar-fosfato e a alteração de bases de ácidos nucleicos (14). O acúmulo de modificações oxidativas em proteínas e lipídios pode levar a alterações na homeostase celular, e consequente morte celular. Por outro lado, alterações em ácidos nucleicos podem ser mutagênicas (alteração na informação) ou citotóxicas, levando também à morte celular (27).

O mtDNA está covalentemente associado à membrana interna da mitocôndria (28), que é um sítio importante de geração de EROs. Devido à alta reatividade das EROs, moléculas que estão mais próximas ao seu sítio de formação têm maior tendência de serem oxidadas. Dessa forma, o mtDNA representa um alvo celular bastante relevante para o ataque oxidativo.

1.3. Lesões oxidativas em DNA

As EROs são moléculas com grande afinidade por sítios eletrodensos, principalmente as espécies radicalares, HO^\cdot e $\text{O}_2^{\cdot-}$, e podem ser adicionados a moléculas ou abstrair espécies como H^\cdot . Em ambos os casos é necessário um rearranjo da molécula, podendo ainda haver adição de outras espécies para esta estabilização e perda do caráter radicalar (14). Os sítios eletrodensos do DNA são principalmente as bases nitrogenadas, mas EROs podem também reagir com a desoxirribose, e os produtos destas duas reações são bastante distintos (29).

1.3.1. OXIDAÇÃO DE BASES NITROGENADAS

O radical HO^\cdot oxida bases nitrogenadas com velocidades próximas àquela da sua difusão, sendo a velocidade de oxidação de purinas ligeiramente maior que a de pirimidinas (30). Os sítios de oxidação por EROs preferenciais são o C5, seguido do

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

C6 de pirimidinas, podendo ainda haver abstração de H[·] da metila de timinas e os carbonos C4, C5 e C8 de purinas. Os produtos de rearranjo molecular destas reações geram uma quantidade enorme de bases modificadas. O nucleotídeo modificado mais estudado é a 8-hidroxi-guanosina (8-OH-dG); esta modificação foi a primeira para a qual foi desenvolvida uma técnica de detecção e, por isso, por muitos anos o dano oxidativo a DNA foi quantificado por detecção de 8-OH-dG. No entanto, *in vitro* esta base modificada é mutagênica em apenas 25 % das duplicações de fita e a sua importância mutagênica *in vivo* não é certa, embora tenham sido identificadas muitas enzimas capazes de remover esta base conforme descrito abaixo (29).

1.3.2. OXIDAÇÃO DO AÇÚCAR

A oxidação da desoxirribose por EROs ocorre a velocidades um pouco menores que o ataque às bases, mas ainda é da mesma ordem de grandeza que a velocidade de difusão destas moléculas em água. As consequências deste tipo de reação são quebra de fita simples, abertura do anel do açúcar ou perda da base, gerando sítios abásicos. Todas essas modificações são citotóxicas, como discutido abaixo (29).

1.3.3. MODIFICAÇÕES MUTAGÊNICAS

A mutagenicidade de modificações oxidativas decorre do fato de que várias dessas modificações são reconhecidas por DNA polimerases replicativas como uma base normal, mas podem formar pares estáveis com bases que não sejam o par canônico da base não modificada (31;32). Um exemplo clássico desse efeito é observado com a 8-hidroxi-guanosina (8-OH-dG), uma das bases oxidadas mais

Introdução

abundantes em DNA celular (33). Na sua conformação nativa anti, 8-OH-dG parecia com dC; no entanto, quando a fita dupla é desfeita (seja para replicação ou transcrição) a base pode adquirir a conformação sin, que parecia estavelmente com dA, gerando um par 8-OH-dG:dA (34). No segundo ciclo de replicação, a replicação da dA leva à incorporação de seu par canônico, T. O resultado final disso é uma mutação de um par G:C para um par T:A. Além de 8-OH-dG, várias outras bases oxidadas são mutagênicas, como as formamidopirimidinas (35). De fato, assinaturas mutagênicas de lesões oxidativas, como as transversões G:C - T:A descritas acima, são observadas em várias condições patológicas, incluindo câncer (36).

É importante ressaltar que também o pool intracelular de desoxirribonucleotídeos trifosfato pode ser oxidado por EROs. Desta forma, a incorporação de um nucleotídeo oxidado, como 8-OH-dGTP, pode resultar em um evento mutagênico, análogo ao que foi descrito acima para bases oxidadas no DNA (37).

1.3.4. MODIFICAÇÕES CITOTÓXICAS

Quando modificações químicas dos ácidos nucleicos não são reconhecidas pelas enzimas DNA- ou RNA-polimerase, estes complexos enzimáticos ficam bloqueados no sítio da lesão e este evento pode ter diferentes consequências. Quando DNA polimerases replicativas tentam replicar DNA com bases não reconhecidas ou sítios abásicos elas desmontam o aparato de replicação e as fitas nascentes são liberadas como quebras de fita dupla (38). Este evento é tóxico para a célula e é efector de sinalização celular de parada de ciclo celular. Esta sinalização pode desencadear a ativação de uma das vias de morte celular, a apoptótica (39), conforme será descrito abaixo. As RNA polimerases também são bloqueadas por

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

lesões ou sítios abásicos, mas as consequências destes eventos são menos drásticas (40).

1.3.5. MODIFICAÇÕES QUE IMPEDEM ASSOCIAÇÕES COM PROTEÍNAS

A sequência do DNA, além de codificar proteínas, é código para associação de proteínas que desempenham papéis fundamentais no controle da manutenção da integridade do próprio DNA e da expressão gênica. Desta maneira, bases oxidadas, como 8-OH-dG, podem alterar a afinidade destas proteínas com a fração de DNA onde está inclusa, podendo evitar ligação de proteínas que deviam ligar ou permitir que proteínas se liguem erroneamente (41). Isso implica que as consequências do acúmulo de modificações oxidativas podem também incluir alterações na expressão gênica e sinalização celular, decorrentes de alterações na interação entre DNA e proteínas (41).

1.4. Lesões ao mtDNA e a homeostase celular

O mtDNA se localiza em um complexo nucleoprotéico, denominado nucleóide, no qual se encontra associado a várias proteínas, como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que além de seu papel em replicação e transcrição do mtDNA, também desempenha um papel estrutural no nucleóide (28). Entretanto, mesmo estando “embebido” nessa estrutura supramolecular, o mtDNA é alvo de ataque por EROs geradas na cadeia transportadora de elétrons. As primeiras comparações entre os níveis de bases 8-OH-dG entre mtDNA e nDNA indicaram que o mtDNA acumulava cerca de 10 vezes mais bases oxidadas do que o nDNA (42). No entanto, estes valores excessivamente altos foram atribuídos a oxidação decorrente da metodologia de extração de mtDNA usada. De fato, Anson e

Introdução

colaboradores analisaram por GC-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) 10 bases oxidadas e não encontraram diferenças significativas nos níveis de oxidação de nDNA e mtDNA (43). Por outro lado, Zastawny e colaboradores encontraram 4x mais 8-OH-dG e 40x mais 5-OH-hidantoina e 5-5-hidroxi-metilhidantoina no mtDNA comparado ao nDNA (44). Mais recentemente, Hamilton e colaboradores encontraram proporção 6x maior de 8-OH-dG em mtDNA comparado a nDNA usando HPLC-CE (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a eletroforese capilar) e uma metodologia de isolamento de DNA que não utiliza solventes orgânicos (45). Assim, ainda não há um consenso na literatura quanto ao acúmulo de bases oxidadas no mtDNA comparado ao nDNA.

Além das doenças mitocondriais causadas por mutações em genes envolvidos na fosforilação oxidativa, diversas condições patológicas foram associadas à disfunção mitocondrial, entre elas: doenças coronarianas, síndrome metabólica/diabetes/obesidade, doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e Huntington), câncer e envelhecimento normal (46-50). Em todos estes casos o fator causal proposto para a disfunção mitocondrial foi o aumento de EROs e do estresse oxidativo que poderia, inclusive, causar acúmulo de modificações oxidativas no mtDNA (51). No entanto, a quantificação destas bases em estudos populacionais ainda é limitada pela necessidade de grande quantidade de amostras, o que dificulta a demonstração de uma relação direta em várias dessas condições.

Um estudo sobre doenças neurodegenerativas nos quais estas bases modificadas foram quantificadas mostra que há acúmulo de lesões oxidativas ao mtDNA (52). Ainda não se sabe, no entanto, se estas lesões foram causadoras das disfunções mitocondriais observadas nestas doenças. Em modelos de hipóxia-

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

reoxigenação foi observado aumento de 8-OH-dG no mtDNA (53;54). Células em cultura também apresentaram quantidades elevadas de bases oxidadas no mtDNA após tratamentos oxidativos ou de estresse (55;56). O maior indício do envolvimento causal de danos oxidativos ao mtDNA em condições patológicas vem de evidências indiretas de estudo de atividades de reparo de danos ao mtDNA aqui listados. Em células de cânceres de mama (57), pulmão (58;59) e próstata (60), a atividade de 8-hidroxi guanina DNA glicosilase (OGG1) está diminuída quando comparada com células normais. Esta enzima é responsável por reparar algumas bases modificadas, entre elas 8-OH-dG e outras modificações de purinas, e está presente tanto no núcleo quanto em mitocôndrias (61), o que sugere haver acúmulo de danos oxidativos ao mtDNA nestas condições. Além disso, um estudo de linhagens de carcinoma de células escamosas resistentes e sensíveis à radiação ionizante indicou que a linhagem sensível tem maior dano ao mtDNA após irradiação e a linhagem resistente apresenta níveis significativamente maiores de OGG1, TFAM e DNA polimerase γ . Estes resultados sugerem uma relação direta entre o acúmulo de danos oxidativos no mtDNA e a sobrevivência celular após o estresse oxidativo (62).

1.5. Integridade mitocondrial e o processo de morte celular

O estudo dos eventos moleculares que causam a perda da viabilidade em células eucarióticas tem recebido uma grande atenção da comunidade científica já há muito tempo. Além da motivação básica de compreender como a integridade funcional das células é mantida, essa área tem muitas implicações diretas em saúde humana, uma vez que morte celular é um evento comum em uma série extensa de patologias, desde intoxicações acidentais até doenças associadas ao

Introdução

envelhecimento, como fragilidade e doenças neurodegenerativas. Além disso, falhas nas vias que controlam esses eventos são fundamentais durante a sequência de etapas que leva à transformação maligna.

Enquanto a morte de uma célula pode resultar de um evento não programado, como a exposição a agentes citotóxicos ou a injúria mecânica, em organismos multicelulares, morte celular programada (ou seja, determinada por um programa molecular intrínseco) tem um papel fundamental na homeostase do organismo. Durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, morte celular é necessária para o remodelamento dos tecidos e na formação de estruturas, como tubos neurais. Por outro lado, mas não menos importante, morte celular programada também é responsável por eliminar células irreversivelmente danificadas, impedindo sua transformação maligna (63;64).

As primeiras diferenciações entre "tipos" de morte celular começaram a ser propostas na literatura no início dos anos 70, quando Kerr e colaboradores (65) propuseram a distinção de um tipo de morte celular que apresentava características morfológicas típicas, que era até então chamada de *shrinkage necrosis*, da morte celular necrótica "normal", que não apresentava nenhuma sequência de alterações morfológicas definidas, e resultava em autólise das células. Kerr, Wyllie e Currie propuseram o termo apoptose (*apoptosis* em inglês) para definir esse tipo de morte celular programada, em referência ao importante aspecto cinético das alterações morfológicas que caracterizam esse processo (66). Dessa forma, foi estabelecida a primeira diferenciação formal entre processos de morte celular acidentais, a partir de então agrupados sob o termo necrose, e processos de morte celular programada, agrupados sob o termo apoptose. Apesar de evidências experimentais para outros

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

tipos de morte celular programada, como necroptose (67), por exemplo, do ponto de vista molecular, a distinção entre esses ainda não é clara.

Do ponto de vista morfológico, necrose não apresenta nenhum padrão claro de alterações, com exceção da desagregação da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular. Entretanto, esse é o evento final, e com pouco valor de caracterização. Por outro lado, apoptose é caracterizada por uma sequência definida de alterações morfológicas: *i*) condensação de estruturas intracelular, em particular da cromatina (dai o nome inicial de *shrinkage necrosis*); *ii*) fragmentação do núcleo e organelas e formação de bolhas na membrana plasmática (*blebbing*); e *iii*) fragmentação da célula em vesículas apoptóticas (sem extravasamento de conteúdo intracelular para o meio extracelular), que são então fagocitadas por células do sistema imune (63;64).

Do ponto de vista molecular, necrose é considerada um processo descontrolado, que resulta de estresses físico-químicos severos, como calor, choque osmótico, estresse mecânico e agentes oxidantes fortes. Nessas condições, a morte celular acontece rapidamente, por alterações profundas na homeostase do meio intracelular, culminando com a ruptura de organelas e da membrana plasmática. Por outro lado, alguns estímulos específicos, como TNF, dsRNA, IFN- γ e depleção de ATP resultam em morte celular necrótica que, no entanto, segue etapas e eventos definidos, sugerindo também a existência de um "programa" molecular para esse tipo de morte. Hoje já é claro que a ativação dos *death-receptors*, receptores da membrana plasmática da superfamília do receptor de TNF, pode resultar tanto em apoptose quanto em necrose, dependendo das condições intracelulares,

Introdução

principalmente da concentração intracelular de ATP. Além disso, a ativação prolongada da enzima poliADP-ribose polimerase (PARP), ativada pela presença de lesões no DNA, resulta numa depleção dos níveis citosólicos de NAD⁺ (doador do grupo ADP-ribose), com conseqüente desbalanço energético intracelular e morte por necrose. Em ambos os casos, morte celular depende da ativação de uma serina/treonina quinase, RIP1, que contém um domínio de morte (DD, *death domain*), crucial para a iniciação do processo de necrose; e da molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*), que contém tanto um DD quanto um domínio efetor de morte (DED, *death effector domain*), que participa na propagação de apoptose (63;64;68).

Do ponto de vista molecular, o processo apoptótico é complexo e não tem um fator iniciador único, mas sim diversas vias de transdução de sinal que possuem elementos comuns. Os processos que resultam na perda da viabilidade se iniciam efetivamente com a ativação de enzimas proteolíticas da família das caspases. Essas enzimas são expressas como pró-caspases inativas, que são ativadas apenas após a clivagem enzimática do zimogênio (63;69).

O processo de apoptose pode ser iniciado de duas formas independentes, mas não excludentes, conhecidas como via extrínseca e via intrínseca. A iniciação por fatores externos se dá por ligação de ligantes de morte como FasL, TNF- α e TRAIL a seus receptores de superfície DR (do inglês, *death receptors*) o que induz a formação dos clusters DISC (do inglês, *death-induced signaling complex*) e assim favorece a dimerização e conseqüente ativação dos zimogênios de caspase 8 e 10. Estes ativam os zimogênios das caspases 3 e 7, que por sua vez ativam a via apoptótica (63;69).

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

Por sua vez, a via intrínseca se inicia com eventos que levam à permeabilização da membrana mitocondrial externa, e liberação dos fatores citocromo c, Omi/HtrA2, Smac/DIABLO, AIF e endonuclease G. O citocromo c se liga ao fator Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease-activating factor 1*) que na presença de ATP e dATP ativam o zimogênio de caspase 9, formando um complexo heptamérico chamado apoptossomo, que executa o programa de morte celular (63;69).

É importante ressaltar que alterações funcionais na mitocôndria são importantes tanto em morte celular necrótica quanto apoptótica. A concentração intracelular de ATP, e alterações desta, deve representar um ponto central na “decisão” celular de qual programa de morte será executado, uma vez que a via apoptótica requer ATP para a fase de execução (como a formação do apoptossomo) (63;69).

1.6. Terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores e morte celular

Substâncias capazes de, quando absorvem luz, formar um intermediário excitado, geralmente em seu estado triplete, com tempo de vida longo o suficiente para transferir energia para outras moléculas são chamadas fotossensibilizadores (FS). Sistemas biológicos possuem vários FS endógenos, como porfirinas e riboflavinas, mas xenobióticos também podem funcionar como FS em células, induzindo dano celular. O uso clínico de FS para induzir morte celular em condições controladas é chamado de terapia fotodinâmica (TFD), que é um tratamento aprovado para alguns tipos de câncer e outras patologias (17;63;70;71). O mecanismo tóxico de FS começou a ser desvendado com os estudos de Foote, que em 1968 demonstrou a formação de 1O_2 pela interação do oxigênio molecular com a

Introdução

espécie triplete excitada do FS ($^3FS^*$), regenerando o FS em seu estado fundamental (17). Esta espécie excitada é resultado de um cruzamento intersistemas ocorrido pelo relaxamento do estado singlete excitado do FS ($^1FS^*$) gerada pela absorção de luz. Foote propôs que existem dois tipos de interação de $^3FS^*$ (a espécie singlete costuma relaxar espontaneamente com emissão de luz) em sistemas biológicos: o tipo I, em que o $^3FS^*$ reage diretamente com outras moléculas, gerando radicais e EROs que causam danos a biomoléculas e o FS não é completamente regenerado; e o tipo II, em que $^3FS^*$ transfere energia para o oxigênio molecular e gera 1O_2 , que causa danos a biomoléculas (17;63;70;71). A Figura 1-3 mostra as etapas envolvidas na TFD.

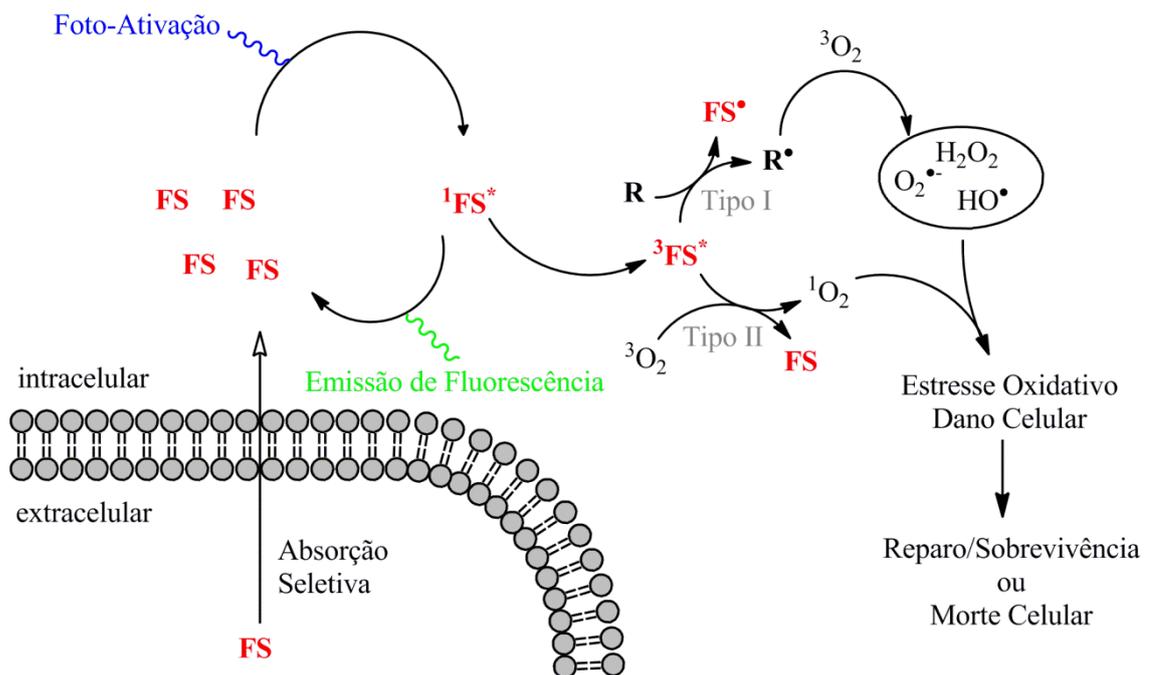


Figura 1-3. Esquema representando os principais eventos no mecanismo de morte celular induzida por fotossensibilizadores durante a terapia fotodinâmica. O FS é ativado pela absorção de luz em comprimento de onda específico e passa ao seu estado ativado, FS^* . Esta espécie pode seguir duas vias, uma radical e outra de transferência de energia direta. O resultado de ambas é a produção de EROs, que exercem os efeitos citotóxicos dos FS. Adaptado de Buytaert *et al.*, 2007 (63).

Vários corantes têm sido testados para uso como FS em TFD. De maneira geral, um FS deve apresentar algumas características específicas para ser efetivo

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

em TFD do tipo II. Estas são: *i*) apresentar alto rendimento quântico de geração de 1O_2 (este número indica a fração de moléculas de 1O_2 geradas por fótons absorvidos pelo FS); *ii*) comprimentos de onda de excitação preferencialmente dentro da chamada janela terapêutica: de 600 a 800 nm, que é a faixa de comprimentos de onda de radiação que não causa dano *per se* e é capaz de atravessar bem tecidos animais; e *iii*) devem ser facilmente absorvidos por células do organismo tratado e preferencialmente melhor absorvidos pelo tipo celular alvo (63;70;71).

Considerando que o intermediário citotóxico, o 1O_2 , é impermeável a membranas biológicas, a localização subcelular dos corantes pode determinar sua eficiência em induzir morte celular. Uma vez que a mitocôndria desempenha um papel central na homeostase celular, e é fundamental tanto ao mecanismo de morte celular necrótico quanto apoptótico, essa organela representa um alvo promissor de FSs (63).

Do ponto de vista clínico, morte celular apoptótica seria preferível à morte celular necrótica a fim de evitar processos inflamatórios causados pelo vazamento do conteúdo celular. Dessa forma, FSs cujo alvo celular principal seja a mitocôndria, e que possam preferencialmente induzir apoptose, despertam grande interesse (63;72).

Nesse estudo utilizamos 3 corantes com características moleculares distintas, que descrevemos a seguir. A Figura 1-4 apresenta as estruturas moleculares desses corantes.

Introdução

1.6.1. AZUL DE METILENO

O azul de metileno (AM) é um corante fenotiazínico de cor azul intensa, que em pH fisiológico apresenta uma carga positiva líquida. O AM é usado no controle de diversas condições patológicas humanas há mais de 100 anos (73-77). e usado em fotossensibilização desde os primeiros estudos utilizando essa abordagem (17). O corante apresenta máximo de absorção em 650 nm (78), fluorescência na região de 660 nm quando excitado em 600 nm (79), e rendimento quântico de geração de 1O_2 de 0,5 em etanol (80). Devido à sua carga, foi inicialmente proposto que o corante teria localização mitocondrial (78). No entanto, dados recentes demonstraram uma colocalização significativa de AM com lisossomas (81-83).

1.6.2. CRISTAL VIOLETA

O Cristal Violeta (CV) é um triarilmetano de cor roxa intensa que em pH fisiológico apresenta carga positiva. O CV é usado em saúde humana há muitos anos (84). O corante apenas é fotoativado se estiver em ambiente de alta viscosidade como, por exemplo, glicerol, solução com alta concentração de proteínas ou o interior da mitocôndria (85). O CV apresenta, nestas condições, máximo de absorção em 590 nm, fluorescência em 632 nm com excitação em 520 nm (85). Sua carga em pH fisiológico também sugere que a molécula se acumule dentro da mitocôndria (82).

1.6.3. Ro 19-8022

O Ro 19-8022 é um benzodiazepínico que foi desenvolvido pela Roche como antiansiolítico mas, durante testes preliminares foi detectado que apresentava efeitos de fotossensibilizador, com geração de 1O_2 (86). Testes de mutagenicidade

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singleto***

em bactérias, leveduras e células de mamíferos demonstraram que Ro é mutagênico nos três modelos, e o perfil mutagênico sugere que esse efeito seja devido, primariamente, à oxidação de guaninas (86-88). O corante apresenta cor amarela não muito intensa e máximo de absorção em 427 nm (87).

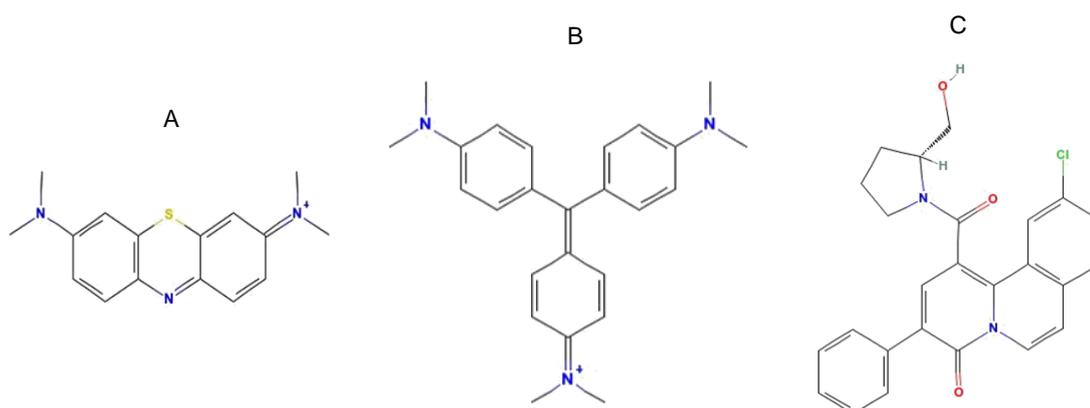


Figura 1-4. Estrutura dos três corantes utilizados nesse estudo. A: Azul de Metileno (AM), B: Cristal Violeta (CV) e C: Ro19-8022 (Ro).

2. Objetivos

Dentro do contexto exposto acima, o objetivo desse trabalho foi investigar qual o papel de lesões oxidativas no DNA mitocondrial para a indução de morte celular por fotossensibilizadores que geram oxigênio singlete. Para isso, desenvolvemos os seguintes objetivos específicos:

- 1 Identificar e caracterizar fotossensibilizadores que se localizam em compartimentos celulares distintos e a geração de oxigênio singlete nesses modelos.
- 2 Quantificar a indução de morte celular por cada um desses fotossensibilizadores.
- 3 Identificar o papel do mtDNA na morte celular induzida por oxigênio singlete gerado pela fotoativação dessas moléculas.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

3. Materiais e Métodos

3.1. Procedência dos reagentes, materiais e equipamentos usados

Os reagentes foram adquiridos de diversas fontes, sempre com graus de pureza compatível com o destino do reagente. O PBS, o meio de cultura DMEM e a agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point*, NMP) usados foram adquiridos de LGC Biotecnologia. A tripsina usada foi adquirida da LGC Biotecnologia ou do Instituto Adolfo Lutz. O soro fetal bovino (SFB) usado foi da LGC Biotecnologia ou da Gibco. A solução de penicilina e estreptomicina 100 x (concentrações finais de 100 U/mL e 100 µg/ml) foi adquirida da Gibco. Os reagentes dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), cloreto de sódio, hidróxido de sódio, metanol e acetonitrila foram adquiridos da Merck. Os reagentes azul de metileno, cristal violeta, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), brometo de etídeo (EtBr), piruvato, uridina, agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*, LMP), isopropanol, etanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O Triton X-100 usado era da Promega. O Mitotracker® Orange CTMRos usado foi adquirido da Life Technologies – a partir deste ponto este reagente é tratado apenas como MitoTracker. O kit para purificação de DNA usado foi o DNAeasy Blood and Tissue da Qiagen. O tris-hidroximetil-amino-metano (Tris) usado foi da GE Healthcare. A proteinase K e a RNase A usadas foram da Invitrogen. O corante Ro 19-8022 foi gentilmente cedido pelo Dr. Elmer Gocke e era da Roche. O DMSO usado no ensaio cometa foi da FMaia. O álcool etílico usado para fixar células e no container de congelamento foi de grau limpeza com 92,8 °INPM.

Materiais e Métodos

Os descartáveis de cultura usados para cultivo de células, como placas e garrafas, foram da TPP ou da Nunc. Os frascos de congelamento usados foram os de 1,5 mL da Nunc. O frasco usado para congelar as células no freezer -80 °C foi o NALGENE Cryo 1 °C Freezing Container. Os tubos de centrifuga de 15 e 50 mL usados eram da TPP e os tubos de 200, 500 1500 e 2000 µL eram da Axygen.

Para a cultura de células foram usadas estufas modelos 3130 ou 3110 da Thermo Forma. A manipulação das células foi feita em ambiente esterilizado de um fluxo laminar Pachane. As leituras de absorção foram feitas em um Nanodrop 1000, Thermo Scientific. As leituras de absorbância ou fluorescência em placas foram feitas em um leitor de placas Spectramax da Molecular Devices do Laboratório do Prof. Etelvino Bechara no IQ-USP.

3.2. Linhagens celulares e manutenção das culturas

A linhagem celular HeLa foi obtida do *Laboratory of Molecular Gerontology, NIA, NIH, EUA*. As células foram mantidas em meio DMEM, contendo antibióticos e 10% de SFB, a 37 °C, 5% CO₂/ ar com 100% de umidade. Estas condições de incubação são, deste ponto em diante, chamadas apenas: estufa de cultura. O meio usado foi DMEM com 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 10% SFB e é chamado, daqui em diante, de meio completo. A manutenção da cultura foi feita de maneira que sempre que fosse atingido 70% de confluência as células fossem desassociadas da placa de cultura por adição de solução de tripsina (1%) e 10% delas fossem transferidas para um frasco de cultura igual ao anterior, ou de maneira que a quantidade de células/área fosse equivalente; cada troca de frasco como esta é denominada, deste ponto em diante, passagem. As células foram usadas até no máximo a passagem 40 desde o descongelamento.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

O descongelamento de células acontecia da seguinte maneira: frascos mantidos em nitrogênio líquido eram retirados e colocados em frascos de cultura pequenos (25 cm²) com mais 4 mL de meio DMEM completo em estufa de cultura e, assim que as células aderissem ao frasco, o meio era trocado por um meio DMEM completo novo. A partir deste ponto, as culturas eram mantidas como descrito acima, tomando o cuidado de não realizar experimentos com células das duas primeiras passagens.

A fim de manter o estoque de células congeladas, nas primeiras passagens (para algumas células) eram feitos frascos que, quando as células atingiam 70% de confluência, eram congeladas. As células eram tripsinizadas com 250 µL de tripsina e após a desassociação 1 mL de meio DMEM era adicionado. A solução resultante era centrifugada em tubo de centrífuga de 2 mL a 500 rpm por 10 min. O sobrenadante era retirado e descartado. Ao pellet era adicionado 1 mL de meio DMEM completo com 8% de DMSO. As células eram então colocadas num frasco de congelamento à temperatura ambiente e levadas ao freezer -80 °C em recipiente de congelamento de células contendo isopropanol por pelo menos 24 h. Após esse tempo, os frascos eram transferidos para um tanque de nitrogênio líquido, sendo devidamente identificados e podendo ser usadas conforme descrito acima, quando necessário.

3.3. Preparo de soluções e tratamentos com corantes

As soluções de AM e CV foram preparadas imediatamente antes do uso. Para o preparo destas soluções foi adicionada a um tubo uma quantidade conhecida de AM ou CV. A esta solução foi adicionado volume conhecido de água bidestilada a

Materiais e Métodos

fim de obter soluções de concentração menor que 1 mM. Esta solução foi filtrada em filtro de seringa de porosidade 0,22 μm e, a partir desta solução inicial, foram preparadas soluções em meio DMEM ou PBS, com as concentrações indicadas dos corantes AM e CV. O manuseio das soluções de corantes, bem como das células a partir de seu primeiro contato com os corantes, foi feito sob iluminação indireta de lâmpada azul.

As soluções de Ro foram preparadas imediatamente antes do uso a partir de uma solução estoque de 23,1 mM de Ro em DMSO, mantida em freezer -80 °C. O manuseio das soluções, bem como das células a partir de seu primeiro contato com o corante, foi feito sob iluminação indireta de lâmpada amarela.

A incubação das células com os corantes foi feita por 30 min em estufa de cultura. Depois da incubação as células foram lavadas 2x com PBS e foram fotoativadas em PBS.

Para irradiação das células tratadas foram usados dois conjuntos de *light-emitting diodes* (LEDs). O primeiro foi gentilmente emprestado pelo Prof. Dr. Maurício Baptista do IQ-USP. O segundo foi adquirido posteriormente pelo nosso laboratório. As doses por tempo de irradiação são mostradas na tabela abaixo. Todas as irradiações foram feitas com a superfície onde as células estavam aderidas distantes 12 cm dos LEDs. O tempo de irradiação é indicado juntamente à dose de energia usada em cada um dos resultados dos experimentos. Para irradiar células tratadas com AM, foi usado o LED vermelho, que tem máximo de emissão em de 700 nm; para irradiar células tratadas com CV, foi usado o LED amarelo, que tem máximo de emissão de 560 nm; e para irradiar células tratadas com Ro, foi usado o LED azul, que tem máximo de emissão de 450 nm.

Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete

Tabela 3-1. Energia irradiada pelos LEDs: quantidade de energia irradiada nas células durante o tratamento. As energias mostradas são referentes à energia a 12 cm de distância dos LEDs.

| | Energia irradiada / J cm⁻² min⁻¹ |
|------------------|---|
| LED Vermelho "1" | 1,27x10 ⁻¹ |
| LED Vermelho "2" | 4,24x10 ⁻² |
| LED Amarelo "1" | 3,18x10 ⁻² |
| LED Amarelo "2" | 2,12x10 ⁻² |
| LED Azul "1" | 8,48x10 ⁻² |
| LED Azul "2" | 1,48x10 ⁻¹ |

3.4. Absorção dos corantes

Células HeLa foram semeadas em placa de 96 poços numa densidade celular de $1,12 \times 10^4$ células/cm² ($3,74 \times 10^3$ células/poço) em DMEM completo. Após 24h o meio foi retirado e as células foram lavadas 1x com PBS. Foi adicionado PBS com concentrações crescentes dos corantes conforme indicado. As células foram incubadas por 30 min em estufa de cultura. O excedente das soluções usadas para tratar as células foi diluído 1x com solução 100 mM SDS. As células foram retiradas da estufa, lavadas 2x com PBS e lisadas com solução 50 mM SDS. Os lisados celulares, bem como as soluções dos corantes em SDS, foram analisados em placa de 96 poços.

3.5. Microscopia confocal

Células HeLa foram semeadas em meio DMEM completo em placas de 6 poços contendo lamínulas de menos de 0,17 mm de espessura estéreis a densidade celular de $1,12 \times 10^4$ células/cm² e incubadas em estufa de cultura. Depois de 24 h as células foram lavadas 1x com PBS e incubadas em estufa de cultura por 15 min em presença do marcador mitocondrial Mitotracker Orange (25nM) em DMEM sem soro. O meio foi retirado e as células foram então incubadas em estufa de cultura com soluções dos corantes em DMEM nas concentrações indicadas por 30 min. As

Materiais e Métodos

células foram então lavadas 2x com PBS, quando necessário, incubadas em estufa de cultura por 5 min com 5 μ M DAPI em PBS e as lamínulas foram retiradas e fixadas numa lâmina contendo 100-200 μ L de Gelvatol, descrito abaixo, e mantidas em local plano e escuro até a solidificação do fixador. As lâminas foram estocadas por pelo menos 48 h e no máximo uma semana antes da análise.

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss, Alemanha) da Central Analítica do IQ-USP com o auxílio de um dos dois técnicos responsáveis. Foram usados canais referentes a cada um dos fluoróforos, conforme a Tabela 3-2. Para obter excitação em 364 nm foi usado um Laser para UV Interprize, para a excitação em 488 nm foi usado um Laser de Argônio e para a excitação em 543 nm foi usado um Laser de Hélio-Neônio. Nestes experimentos foram usadas objetivas de 63x e 100x com uso de óleo de imersão (Zeiss). As faixas de leitura da emissão foram selecionadas por uma grade de difração. Os canais de leitura da emissão foram selecionados analisando células incubadas com cada um dos corantes ou marcadores usados, bem como combinações entre eles, não sendo usadas células incubadas com mais de um dos corantes AM, CV e Ro. A seleção da espessura de análise (*pinhole*) se deu em cada experimento visando a melhor observação e não pôde ser mantida devido à variação de absorção dos marcadores e corantes usados nas diferentes condições.

Tabela 3-2. Canais usados para microscopia confocal

| Atribuição | Cor usada nas imagens | Comprimento de onda do laser de excitação | Faixa de leitura de emissão |
|---------------------------|------------------------------|--|------------------------------------|
| MitoTracker Orange | Vermelho | 543 nm | 565-587 nm |
| AM ou CV | Verde | 488 nm | 672-704 nm |
| RO | Verde | 364 nm | 458-490 nm |
| DAPI | Azul | 364 nm | 385-470 nm |

- Soução Gelvatol: Meio de montagem preparado pela mistura de 100 mL de 140 mM NaCl e 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,2, 25 g de álcool

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

polivinílico e 50 mL de glicerol. Esta solução foi gentilmente cedida pelo Dr Isaias Glezer, IQ-USP.

3.6. Quantificação de oxigênio singlete

A quantificação de oxigênio singlete foi feita em colaboração com o Dr. José Pedro Angeli, então doutorando no Laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio do IQ-USP, com metodologia descrita em sua tese de doutorado defendida no mesmo instituto em 2011. Ele nos cedeu o captador e o padrão interno, e realizou as análises cromatográficas e integração dos dados, como descrito no item 3.6.2.

3.6.1. TRATAMENTO OXIDATIVO DAS CÉLULAS NA PRESENÇA DO CAPTADOR DE OXIGÊNIO SINGLETE DIETIL 3,3'-(9,10-ANTHRACENODIIL)BISACRILATO (DADB)

Em placas de 6 poços, $1,0 \times 10^5$ células HeLa foram semeadas em meio DMEM completo (densidade celular: $1,12 \times 10^4$ células/cm²). Depois de incubadas por 21 h na estufa de cultura, o meio foi retirado, foi adicionado 1 mL/poço de meio DMEM completo contendo 20 µM de DADB e as células foram incubadas em estufa de cultura por 3h. O meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x. Foi adicionado 2mL de meio DMEM com as concentrações indicadas dos corantes. As células foram incubadas por 30 min, lavadas 2x com PBS e, quando indicado, fotoativadas em PBS com o LED específico para o corante usado. O PBS foi retirado e as células foram raspadas com 500 µL de PBS contendo 1 pmol de padrão interno (endoperóxido do 9,10-difenilantraceno, DPAO2) e transferidas para tubos Eppendorf. Para a extração, foi adicionado 1 mL de mistura clorofórmio:metanol (1:1, v:v) em cada frasco, o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 g por 5 min. A fração orgânica foi transferida para um novo frasco e evaporada em banho

seco a 45 °C em ambiente com alta circulação de ar e no escuro. O precipitado obtido foi dissolvido em 140 µL de 70% acetonitrila/água e analisado conforme descrito abaixo.

3.6.2. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ENDOPERÓXIDO DIETIL 3,3'-(9,10-ANTRACENODIIL)BISACRILATO (DADBO2)

Utilizou-se um sistema de HPLC Agilent constituído por um autoinjeter Agilent 1200 *High performance* resfriado a 4 °C, Bomba Agilent 1200 Binary pump SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 18 °C e um software Analyst 1.4.2. Uma segunda bomba Agilent (1200 *Isocratic pump* SL) foi usada para manter um fluxo constante para o espectrômetro de massa durante a análise.

As análises foram realizadas com duas colunas, sendo a primeira uma coluna Phenomenex C8(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 µm e a segunda uma Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, Agilent, com um gradiente de 60% a 95% de acetonitrila em 20 minutos (1 mL/min) contendo 0,1% ácido fórmico. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: a 4 min, permitindo que o eluente da primeira coluna entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massas, e outra vez após a lavagem da segunda coluna. O tempo total desta análise é de 25 min.

O endoperóxido foi analisado com ionização por *eletrospray* no modo positivo e detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM), em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida *íon trap* linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems).

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

A quantificação foi realizada criando-se uma curva de 1 a 250 fmol de DADBO2 utilizando DPAO2 como padrão interno.

3.7. Medida de proliferação celular

Células HeLa foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² em placas de 24 poços e incubadas em meio DMEM completo em estufa de cultura. Após 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com soluções dos corantes em DMEM, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado. Células não tratadas com corantes foram fixadas nesta etapa adicionando 500 µL de álcool e removendo em seguida; esses pontos experimentais representam a densidade populacional no tempo 0 h de proliferação. As células foram então incubadas com meio DMEM completo em estufa de cultura por 24 h, e então fixadas como as anteriores. Depois que o álcool secou, foi adicionado 500 µL de solução 1 M de NaOH a cada poço e homogeneizado. As placas foram novamente incubadas em estufa de cultura por 1 h. Foi lida a absorbância da solução resultante a 260 nm em triplicata.

Para o cálculo da proliferação, o crescimento de culturas controle (100% de proliferação) foi obtido através da diferença entre as células fixadas logo depois do tratamento e as fixadas após as 24 h de incubação. A porcentagem de proliferação para cada concentração de corante foi obtida pela equação abaixo, em que P_a é a % de proliferação da condição "a", A_a foi a média das absorbâncias obtidas para as amostras tratadas com a condição "a" após 24h de incubação, A_{24} foi a média das absorbâncias obtidas para as amostras não tratadas com corante após 24h de

incubação e A_0 foi a média das absorvâncias obtidas para as amostras não tratadas com corante e fixadas logo após o tratamento.

$$P_a = 100 \frac{(A_a - A_0)}{(A_{24} - A_0)}$$

3.8. Medida de sobrevivência celular

3.8.1. BAIXA DENSIDADE CELULAR

Células HeLa foram semeadas a 8 células/cm² em placas de 10 cm de diâmetro (500 células/placa) e incubadas em meio DMEM completo em estufa de cultura. Depois de 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com soluções dos corantes em DMEM, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado. Em seguida, foram incubadas em estufa de cultura por 7-10 dias até que fosse possível visualizar colônias a olho nu (> 50 células).

3.8.2. ALTA DENSIDADE CELULAR

Células HeLa foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço) e incubadas em meio DMEM completo em estufa de cultura. Depois de 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com soluções dos corantes em DMEM, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado. As células foram então tripsinizadas, contadas e semeadas em meio DMEM completo a uma densidade de 8 células/cm². Foram então incubadas em estufa de cultura por 7-10 dias até que fosse possível visualizar colônias.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

3.8.3. PROCESSAMENTO DAS PLACAS COM COLÔNIAS E CÁLCULO DE SOBREVIVÊNCIA

Após a remoção do meio de cultura, as colônias foram lavadas com PBS e fixadas com álcool etílico (colocar na placa volume de álcool suficiente para cobrir a região com colônias, retirar o álcool e deixar o excesso evaporar) e coradas com solução 1% AM ou CV (cobrir a região onde houve células com a solução do corante, remover e lavar com cuidado em água). As colônias formadas foram contadas e a % de sobrevivência foi calculada segundo a equação abaixo, em que S_a foi a porcentagem de sobrevivência para a concentração de corante “a”, N_a foi a média de colônias contadas nas placas tratadas com concentração de corante “a” e N_c foi a média de colônias contadas nas placas não tratadas com corantes.

$$S_a = 100 \frac{N_a}{N_c}$$

3.9. Ensaio cometa

3.9.1. SOLUÇÕES

- Solução de Lise (estoque): 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA;
- Solução de Lise (uso): 10% DMSO, 1% Triton X100 / solução de lise (estoque)*;
- Tampão de Eletroforese: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,0*;
- Tampão de neutralização: Tris-HCl 0,4 M pH 7,5;
- Agarose NMP 1,5%: Agarose Normal Melting Point (NMP) 1,5 g, PBS 100 mL;

Materiais e Métodos

- Agarose LMP 0,5%: Agarose Low Melting Point (LMP) 100 mg, PBS 20 mL.

* Estas soluções foram preparadas poucas horas antes do uso.

3.9.2. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Em um béquer de capacidade superior a 250 mL foi fervido o PBS e a agarose NMP foi dissolvida em PBS por aquecimento. A solução foi deixada solidificar e novamente aquecida até a dissolução completa por 2x. O volume foi acertado novamente com água deionizada. A solução foi dividida em 2 tubos de centrifuga de 50 mL. O tubo de centrifuga foi mantido em banho-maria a 60 °C; as lâminas foram mergulhadas uma a uma no tubo e a solução de um dos lados da lâmina foi retirada. As lâminas foram deixadas secando em posição horizontal (alinhada) por cerca de 16h.

3.9.3. PROCEDIMENTO PARA O ENSAIO COMETA

Células HeLa foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² em placas de 6 poços e incubadas em meio DMEM completo em estufa de cultura. Após 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com soluções dos corantes em DMEM, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado. Já com a solução de agarose LMP num banho-maria a 37 °C próximo, as células foram tripsinizadas e a tripsina foi inativada com meio DMEM completo. A suspensão de células foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada a 200 g por 10 min. Quase todo o sobrenadante foi removido, deixando 200 µL. Foram transferidos 10 µL da suspensão e 120 µL de agarose LMP para um novo tubo, e rapidamente homogeneizados. Da suspensão

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

resultante 60 µL foram distribuídos para cada lâmina já recoberta por agarose NMP seca e uma lamínula foi colocada sobre a agarose. As lâminas foram deixadas solidificando por 10 a 20 min em geladeira (4 °C).

As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise a 4 °C por 1,5h. Todo o procedimento foi realizado com luz indireta azul devido ao uso do corante AM, a partir desta etapa tomou-se o cuidado de diminuir a luz o máximo possível devido à suscetibilidade dos nucleóides a danos adicionais causados por luz, em especial luz vermelha. As lâminas foram lavadas mergulhando-as em PBS. As lâminas foram distribuídas em uma cuba de eletroforese de modo a preencher completamente a largura da cuba (foi necessário usar um fragmento de lâmina para preencher um espaço numa das laterais). O tampão de eletroforese foi adicionado e foi deixado desnaturando por pelo menos 25 min. A eletroforese foi feita por 25 min a 25 V e 300 mA. O volume de tampão de eletroforese foi ajustado para alcançar estes valores (para aumentar a voltagem, adicionou-se tampão; para diminuir, retirou-se). As lâminas foram retiradas com cuidado e mergulhadas em solução de neutralização por 15 min, o tampão foi trocado de 5 em 5 min. As lâminas foram secas em posição inclinada e fixadas com álcool etílico mergulhando-as no álcool por 10 min. As lâminas foram estocadas a 4 °C até a análise.

3.9.4. ANÁLISE DAS LÂMINAS GERADAS NO ENSAIO COMETA

A análise das lâminas foi feita no laboratório da Profa. Dra. Marisa Medeiros. Para a análise foi adicionado 100 µL de solução 0,02 mg/mL de brometo de etídeo à lâmina e coberto com lamínula. Depois de 5 minutos foi feita a análise em

Materiais e Métodos

microscópio de fluorescência (Nikon) sob um aumento de 20x (na objetiva), usando um filtro de 420-490 nm para excitação e um filtro de barreira de 520 nm. Com o auxílio do software KOMET 6.0 (Andor) foram delimitadas áreas de núcleo e cauda para 50 células de cada lâmina. O software fornece medida de *Olive Tail Moment* (89) para cada amostra, além de várias outras. Os dados apresentados são a média dos 100 nucleóides analisados para cada condição.

3.10. Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação internucleossômica

3.10.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Células HeLa foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² em placas de 6 poços e incubadas em meio DMEM completo em estufa de cultura. Depois de 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com solução 10 µM de ionóforo de Ca²⁺ A23198 ou soluções de AM em DMEM, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado, sendo que as células tratadas com A23189 não foram fotoativadas. Foi adicionado meio DMEM completo e as células foram deixadas em estufa de cultura por 24h.

3.10.2. ISOLAMENTO DE DNA POR *SALTING-OUT*

O meio de cultura foi coletado e as placas foram raspadas com PBS. O meio e o PBS contendo as células foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 100 µL de tampão de lise (ver composição abaixo) com proteinase K para cada 200.000 células. Foi medida a concentração de proteína das amostras. A solução, quando necessário, foi diluída com o tampão de lise com proteinase K para obter no máximo 10 mg/mL de proteína. A mistura foi incubada a

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

55 °C por 1 h. Foi adicionado ¼ de volume de solução saturada de NaCl e incubado a 55 °C por 15 min. A mistura foi então colocada em gelo até gerar precipitado branco e foi centrifugada a 16.000 g por 7 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado, o precipitado foi aquecido a 55 °C novamente e foi repetida a centrifugação. Os sobrenadantes foram combinados e a eles foi adicionado 2,5x seu volume em álcool etílico a 4 °C. A mistura foi deixada a -20 °C por 16h. A solução foi então centrifugada a 16.000 g por 30 min. O precipitado foi lavado com 80% álcool etílico/água gelada e centrifugada novamente por 5 min. O precipitado foi seco na capela. Cada um dos precipitados foi ressuspensão em no mesmo volume inicial de tampão TE, ver composição abaixo. Foi adicionada RNase-A para obter concentração final de 100 µg/mL e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 h. Foi adicionado volume igual ao inicial de tampão de lise com proteinase K e a mistura foi incubada por 1h a 55 °C. Foi adicionada solução 10% SDS a fim de obter concentração final de 1%. Foi adicionado ¼ de volume de solução saturada de NaCl. A mistura foi então colocada em gelo até gerar precipitado branco e foi centrifugada a 16.000 g por 4 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado, o precipitado foi aquecido a 55 °C novamente e foi repetida a centrifugação. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 2,5x o volume de álcool etílico, e esta mistura foi deixada a -20 °C por 2h. A solução foi então centrifugada a 16.000 g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com 80% álcool etílico/água gelada e centrifugada novamente por 5 min. O precipitado foi seco em capela e ressuspensão em água deionizada. A quantificação do DNA e verificação de contaminação por álcool foi feita por espectrofotometria UV-Vis.

Materiais e Métodos

- Tampão de lise: 10 mM Tris.HCl pH 8,2; 2 mM EDTA, 400 mM NaCl e 1 % SDS.
- Tampão TE: 10 mM Tris.HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA.

3.10.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS AMOSTRAS

Foi preparado um gel 1,2 % de agarose em tampão TAE (ver componentes abaixo) no qual foram colocados 5 µg de amostra de DNA por poço. A eletroforese foi feita em tampão TAE a 120 V. O gel foi corado com solução 10 µg/mL brometo de etídeo e a imagem foi registrada num fotodocumentador.

- Tampão TAE: 40 µM Tris-Acetato, 1 µM EDTA, pH ~ 8,5

3.11. Geração de clones HeLa *rho*^{-/0}

Para a geração dos clones, sua manutenção e para os experimentos com estas células foi usado meio DMEM completo suplementado com 100 µg/mL piruvato e 50 µg/mL uridina e que, a partir deste ponto, é chamado meio DMEM suplementado com piruvato e uridina.

Células HeLa foram cultivadas com brometo de etídeo em concentrações de 50 ng/mL por 25 passagens, 125 ng/mL por 25 passagens e 250 ng/mL por 30 passagens em meio DMEM suplementado com piruvato e uridina.

Estas células foram semeadas em meio DMEM suplementado com piruvato e uridina a uma densidade celular de 0,5 célula/poço em placa de 96 poços, para seleção clonal. As culturas foram observadas até que colônias (> 50 células) individuais fossem identificadas. Destas, 6 clones foram escolhidos e expandidos, e

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

após o estabelecimento de culturas, cada clone foi testado para a perda de mtDNA por qPCR, como descrito a seguir.

3.12. Quantificação de mtDNA e nDNA

DNA de células HeLa controle (mantidas em meio livre de EtBr - e identificadas como WT) e dos clones gerados acima, foi isolado usando-se o protocolo para células em cultura do kit DNAeasy, como recomendado pelo fabricante.

Para a quantificação do mt- e nDNA, foi feito qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) com o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, cat# 4367659), em um termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), com o programa padrão para qPCR, a saber: um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minutos. Após a amplificação foi realizada uma curva de dissociação para verificar a fidelidade da reação, ou seja, a formação de um único produto alvo. A análise dos dados foi feita segundo proposto por Pfaffl, 2001 (90). As sequências dos *primers* (Invitrogen) usados são mostradas na Tabela 3-3.

Tabela 3-3. *Primers* usados na reação de qPCR.
Sequência 5' → 3'

| | |
|----------------------|---------------------------|
| mtDNA <i>forward</i> | ACCCTATTAACCACTCACGGGAGCT |
| mtDNA <i>reverse</i> | GCGACATAGGGTGCTCCGGC |
| HPTR <i>forward</i> | TTTACGTCACGCGAGGGCGG |
| HPTR <i>reverse</i> | GCAGGCGGCACATGTCAACC |

Para cada leitura foram usados 100 ng de DNA isolado, 200 nM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) referente ao fragmento a ser quantificado conforme a Tabela 3-3, e *Power SYBR Master mix* na concentração final de 1x. Para as amostras controle, foram feitas também reações contendo 1, 10 e 1000 ng de DNA,

Materiais e Métodos

com a finalidade de se calcular a eficiência do par de *primers*. A partir dos dados de C_T (**c**ycle **t**hreshold) para cada par de *primers*, na curva com quantidades crescentes de DNA HeLa controle, foi calculada a eficiência de amplificação dos *primers*, conforme descrito abaixo, onde *slope* é inclinação da reta resultante da plotagem de CT x massa de DNA, e E corresponde à eficiência do *primer*.

$$E_{\text{primer}} = 10^{-1/\text{slope}}$$

A amplificação relativa para cada uma das amostras foi calculada segundo a equação abaixo.

$$\text{Amplificação Relativa} = \frac{E_{\text{mtDNA}}^{(C_{T\text{controle-mtDNA}} - C_{T\text{amostra-mtDNA}})}}{E_{\text{HPRT}}^{(C_{T\text{controle-HPRT}} - C_{T\text{amostra-HPRT}})}}$$

3.13. Avaliação de sobrevivência de células *rho*^{-/0}

Células HeLa WT e células HeLa *rho*⁻ Clone 3 foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² em placas de 6 poços e incubadas em meio DMEM suplementado com piruvato e uridina em estufa de cultura. Depois de 24 h as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas soluções dos corantes em PBS, conforme indicado e incubadas por 30 min. As células foram então lavadas e fotoativadas em PBS conforme indicado, e em seguida tripsinizadas. A densidade celular da suspensão foi medida e foram semeadas 5000 células em poços de 9 cm² (placas de 6 poços). Após 4 dias de crescimento, as colônias resultantes foram fixadas e coradas como descrito no item 3.8.3.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

4. Resultados

Para investigar o papel do mtDNA na morte celular induzida por danos oxidativos decidimos estabelecer modelos celulares em que o estresse oxidativo fosse gerado apenas no compartimento mitocondrial, em comparação com a condição em que o estresse oxidativo fosse gerado em toda a célula. A geração de estresse oxidativo restrito a compartimentos específicos representa um desafio técnico, uma vez que peróxido de hidrogênio é facilmente difusível através de membranas biológicas (91), e o radical ânion superóxido é rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos (14). Em razão disso, escolhemos a estratégia de utilizar fotossensibilizadores que apresentam localização intracelular restrita, e que geram oxigênio singlete apenas quando excitados pela absorção de luz em comprimentos de onda específicos. Neste estudo, utilizamos duas substâncias que apresentam carga líquida positiva em pH fisiológico e tendem a acumular-se no compartimento mitocondrial: o azul de metileno (AM) e o cristal violeta (CV). Em contrapartida, utilizamos o corante Ro19-8022 que também gera oxigênio singlete, mas não apresenta carga líquida em pH fisiológico.

4.1. Captação, localização e fotoativação dos corantes

O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa (16) que ataca biomoléculas próximas ao seu local de formação. Assim, iniciamos esse estudo caracterizando o modelo celular quanto à internalização dos corantes, bem como sua localização e geração de oxigênio singlete.

Resultados

4.1.1. CAPTAÇÃO

Para demonstrar a captação dos corantes pelas células durante o período de tratamento utilizado nesse estudo, foram medidos os espectros de absorção das soluções dos corantes utilizadas nos tratamento e dos lisados de culturas tratadas com concentrações crescentes dos corantes.

Estes experimentos foram realizados em triplicata, e espectros representativos são apresentados.

Para o AM, são mostrados na Figura 4-1 os espectros de absorção entre 550 e 700 nm de soluções de AM com metade das concentrações usadas para tratar as células (painel A) e dos lisados celulares das células tratadas com AM por 30 min no escuro (painel B). Comparando os painéis A e B observa-se que houve absorção proporcional à concentração utilizada do corante nas condições usadas, sendo proporcionalmente maior para as concentrações mais altas de AM.

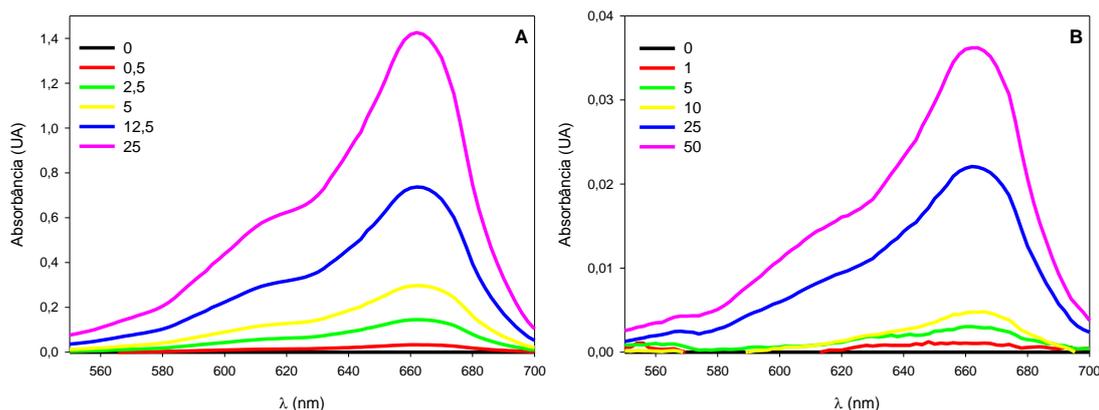


Figura 4-1. Captação de AM: Espectros de absorção de (A) soluções de AM em 50 mM SDS, concentrações de AM indicadas e (B) lisados de células HeLa tratadas com soluções com as concentrações indicadas de AM por 30 min, lavadas e submetidas a lise com solução de lise 50 mM SDS. Resultados representativos de dois experimentos, realizados em triplicata.

Para o CV são mostrados na Figura 4-2 os espectros de absorção entre 500 a 650 nm de soluções de CV com metade das concentrações usadas para tratar as

Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete

células (painel A) e dos lisados celulares das células tratadas com CV por 30 min no escuro (painel B). Observamos que houve absorção do corante CV pelas culturas, de forma proporcional à concentração do corante usada durante o tratamento, sendo proporcionalmente maior para concentrações mais baixas do corante.

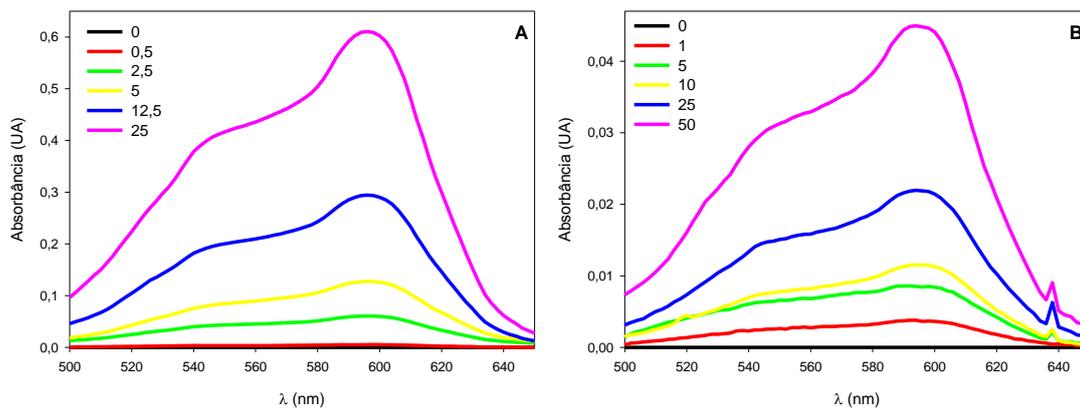


Figura 4-2. Captação de CV: Espectros de absorção de (A) soluções de CV em 50 mM SDS, concentrações de CV indicadas e (B) lisados de células HeLa tratadas com soluções com as concentrações indicadas de CV por 30 min, lavadas e submetidas a lise com solução de lise 50 mM SDS. Resultados representativos de dois experimentos, realizados em triplicata.

Para o Ro19-8022 são mostrados na Figura 4-3 os espectros de absorção entre 270 a 470 nm de soluções de Ro com metade das concentrações usadas para tratar as células (Painel A) e dos lisados celulares das células tratadas com Ro por 30 min no escuro (Painel B). Devido à região de absorção de radiação do corante, e ao fato de que essa molécula apresenta coeficiente de absorção de radiação menor que os outros dois corantes, não é possível observar espectros de absorção claramente definidos em concentrações menores que 50 μ M. Assim foi acrescentado, para ilustração, um tratamento com 250 μ M de Ro. Diferenças na quantidade de células podem ter contribuído para a variação de absorbância observada para as concentrações mais baixas de Ro. É possível observar, no

Resultados

entanto, que houve absorção do corante ao analisar as curvas de 50 e 250 μM do corante.

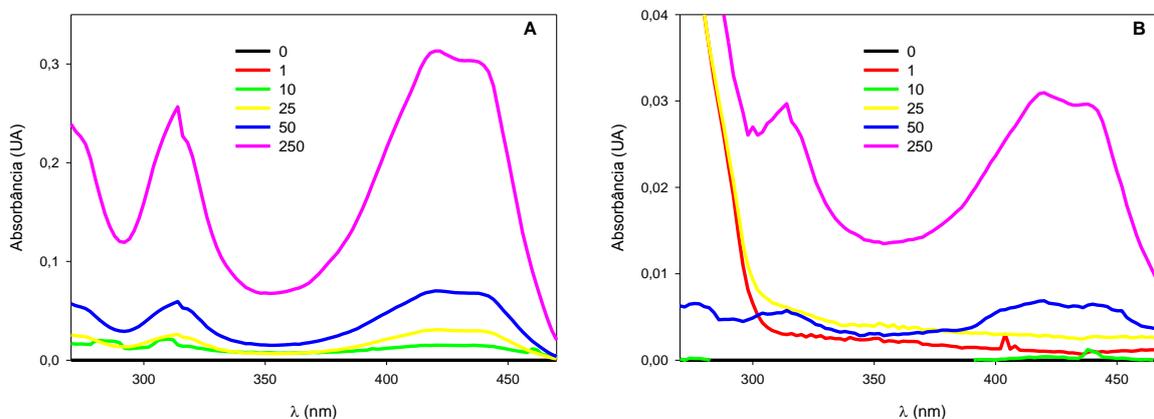


Figura 4-3. Captação de Ro: Espectros de absorção de (A) soluções de Ro em 50 mM SDS, concentrações de Ro indicadas e (B) lisados de células HeLa tratadas com soluções com as concentrações indicadas de Ro por 30 min, lavadas e submetidas a lise com solução de lise 50 mM SDS. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicata.

Os dados acima indicam que células HeLa absorvem os corantes usados neste estudo de forma aproximadamente proporcional à concentração à que são expostas durante os 30 min de tratamento.

4.1.2. LOCALIZAÇÃO

A localização intracelular dos corantes foi estudada por microscopia confocal. Esta técnica permite a visualização precisa da localização intracelular de moléculas fluorescentes, uma vez que permite a análise das células em planos focais bem restritos. O objetivo da técnica é registrar a fluorescência de uma fatia selecionada do campo com espessura escolhida para cada conjunto de laser para irradiação e comprimento de onda para registro da luz emitida. Assim, se a fatia escolhida é fina o suficiente e há sobreposição de sinais em diferentes canais, é muito provável que os fluoróforos analisados nestes canais estejam no mesmo compartimento subcelular. A localização intracelular dos corantes AM e CV já havia sido estudada

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

por microscopia confocal (82), assim, apenas adequamos os comprimentos de excitação e emissão. Para o corante Ro, realizamos análise preliminar por espectroscopia de fluorescência e dados da literatura (87) para identificar os comprimentos de onda de excitação e emissão para os estudos de microscopia.

Para identificar a localização das mitocôndrias, e permitir a colocação dos corantes, utilizamos o indicador MitoTracker Orange, que se acumula em mitocôndrias em células vivas devido à diferença de carga entre a matriz mitocondrial e o citosol, mas uma vez dentro da mitocôndria, estabelece ligações covalentes com resíduos expostos de cisteína. Dessa forma, o MitoTracker fica “preso” na organela mesmo após a fixação das células (92).

Experimentos preliminares e dados da literatura indicam que corantes AM e CV diminuem temporária ou permanentemente o potencial elétrico de membrana mitocondrial, que é o responsável pela localização dos marcadores de mitocôndria clássicos, inclusive o MitoTracker Orange. Por isso, escolhemos adicionar o marcador às culturas 15 minutos antes do tratamento com o corante a ser estudado. Desta maneira, quando os corantes entraram em contato com as células o marcador já havia, em grande parte, se ligado covalentemente a proteínas mitocondriais. A escolha dos canais para análise de AM, CV e MitoTracker incluiu uma análise de células incubadas com apenas cada um em ambos os canais. A tentativa de análise de células tratadas com um ou outro em equipamentos que usassem filtros para seleção de comprimentos de onda de emissão mostrava sobreposição dos canais. Foi necessário usar um equipamento que tem uma grade de difração para seleção

Resultados

precisa dos comprimentos de onda de emissão e, apenas então foi possível separar os canais dos corantes e do marcador.

Na Figura 4-4 são mostradas imagens de microscopia confocal de células incubadas com 25 μ M AM, 25 nM MitoTracker Orange e 5 μ M DAPI. Nos painéis A, B e D são mostradas as fluorescências de MitoTracker, AM e DAPI, respectivamente. No painel C é mostrada a luz transmitida, o painel E apresenta a imagem composta dos quatro canais e o painel F apresenta a imagem composta dos painéis A, B e D. As imagens apresentadas no painel A indicam que o AM tem localização majoritariamente citoplasmática, uma vez que muito pouca sobreposição com o sinal fluorescente de DAPI (painel C) foi observada. Por outro lado, as imagens apresentadas no painel F indicam uma grande co-localização entre os sinais de AM e MitoTracker, que na micrografia composta aparece como sinal laranja, indicando que o AM acumula nas mitocôndrias das células tratadas segundo o protocolo apresentado neste trabalho.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

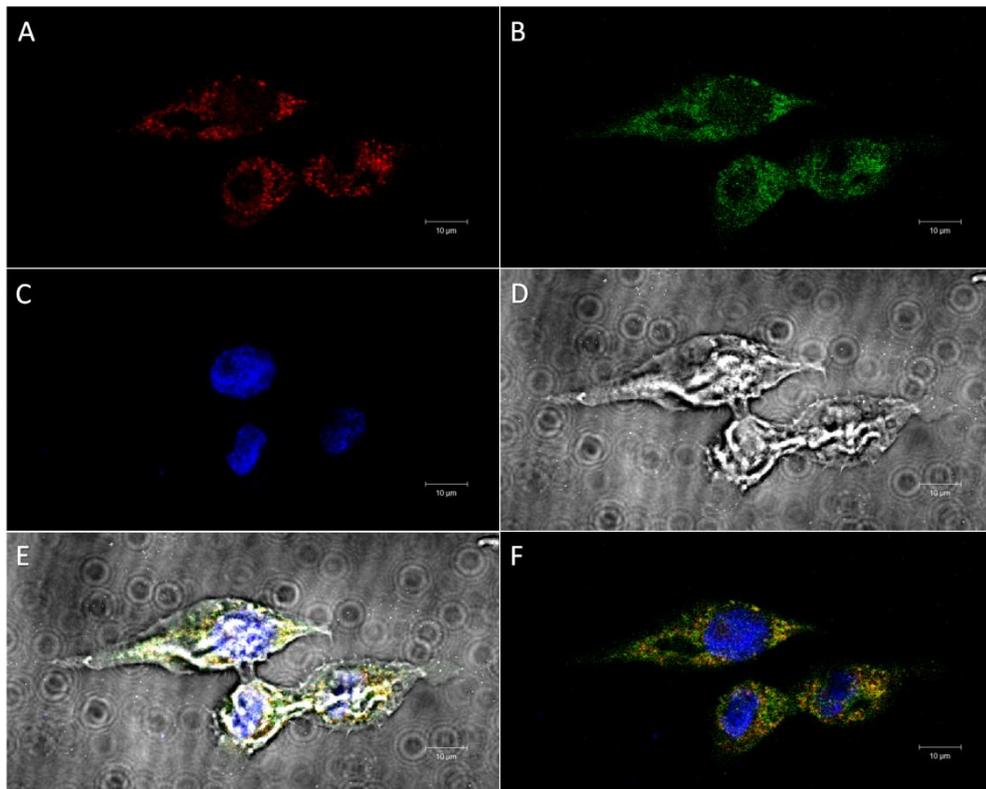


Figura 4-4. Localização intracelular de AM: Microscopia confocal de células HeLa tratadas com 25 μ M AM, 25 nM de Mitotracker Orange e 5 μ M DAPI. Canais A, B e C conforme descrito na Tabela 3-2. Painel A: canal de Mitotracker, *pinhole*: 150 μ m, laser: 543 nm a 56%, registro de emissão de 565 a 587 nm; Painel B: canal de AM, *pinhole*: 174 μ m, laser: 488 nm a 40%, registro de emissão de 672 a 704 nm; Painel C: canal de DAPI, *pinhole*: 188 μ m, laser: 364 nm a 68%, registro de emissão de 385 a 470 nm; Painel D: luz transmitida, laser: 488 nm a 31%; Painel E: Somatória dos canais A, B, C e D; Painel F: Somatória dos painéis A, B e C. A barra indica 10 μ m.

Na Figura 4-5 são mostradas imagens de microscopia confocal de células incubadas com 1 μ M CV, 25 nM MitoTracker Orange e 5 μ M DAPI. O canal de luz transmitida, na ocasião do experimento, não apresentava o contorno das células e por isso não foi registrado. No painel A é mostrada a fluorescência de MitoTracker Orange que, apesar de ser um marcador de mitocôndrias, parece estar marcando algo dentro do núcleo que, no entanto não é corado por DAPI. Acreditamos que o marcador tenha se ligado inespecificamente a algum componente do nucléolo. Nos painéis B e C são mostradas as fluorescências de CV e DAPI, respectivamente. O painel D apresenta a imagem composta dos três canais. De maneira similar ao observado para o AM, a localização de CV é majoritariamente citoplasmática, uma

Resultados

vez que nenhum sinal de CV foi detectado na região nuclear, identificada pela fluorescência de DAPI (painel C). Por outro lado, grande parte do sinal de CV colocaliza com o sinal de MitoTracker Orange (painel D). Isso indica que a localização intracelular de CV é majoritariamente mitocondrial.

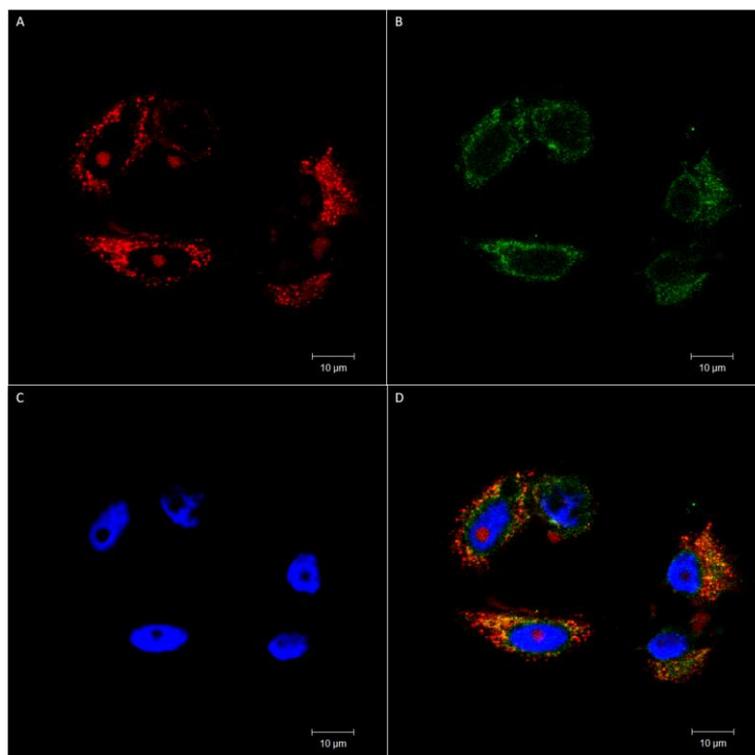


Figura 4-5. Localização intracelular de CV: Microscopia confocal de células HeLa tratadas com 1µM CV, 25 nM de Mitotracker Orange e 5µM DAPI. Canais A, B e C conforme descrito na Tabela 3-2. Painel A: canal de MitoTracker, *pinhole*: 240 µm, laser: 543 nm a 56%, registro de emissão de 565 a 587 nm; Painel B: canal de CV, *pinhole*: 232 µm, laser: 488 nm a 100%, registro de emissão de 672 a 704 nm; Painel C: canal de DAPI, *pinhole*: 244 µm, laser: 364 nm a 6%, registro de emissão de 385 a 470 nm; Painel D: somatória dos painéis A, B e C.

Em ambos os casos de AM e CV, notamos que a localização intracelular dos corantes é principalmente citosólica, apesar de não ser exclusivamente mitocondrial. Essa conclusão decorre da observação da presença de sinal verde (corante) que não co-localiza com o sinal vermelho (MitoTracker). Entretanto, para efeito do objetivo desse estudo, a observação de que ambos os corantes excluem do núcleo justifica sua utilização com modelos de geradores de dano oxidativo exclusivamente ao mtDNA.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

Na Figura 4-6 são mostradas imagens de microscopia confocal de células incubadas com 1 μ M Ro e 25 nM MitoTracker Orange. Não foi possível usar células marcadas com DAPI, pois a fluorescência deste marcador coincide com a fluorescência do Ro. Os painéis A e B apresentam a fluorescência de MitoTracker e Ro, respectivamente, enquanto o painel C apresenta a imagem de luz transmitida do campo. O painel D apresenta a imagem composta dos três canais, e o painel E apresenta a imagem composta de A e B. Nessas imagens observamos que o corante Ro se localiza em toda célula, sem demonstrar localização preferencial por nenhum compartimento intracelular. Observamos alguma co-localização com o sinal de MitoTracker, indicando localização mitocondrial, que no entanto deve ser causada pela localização difusa do corante através do citosol.

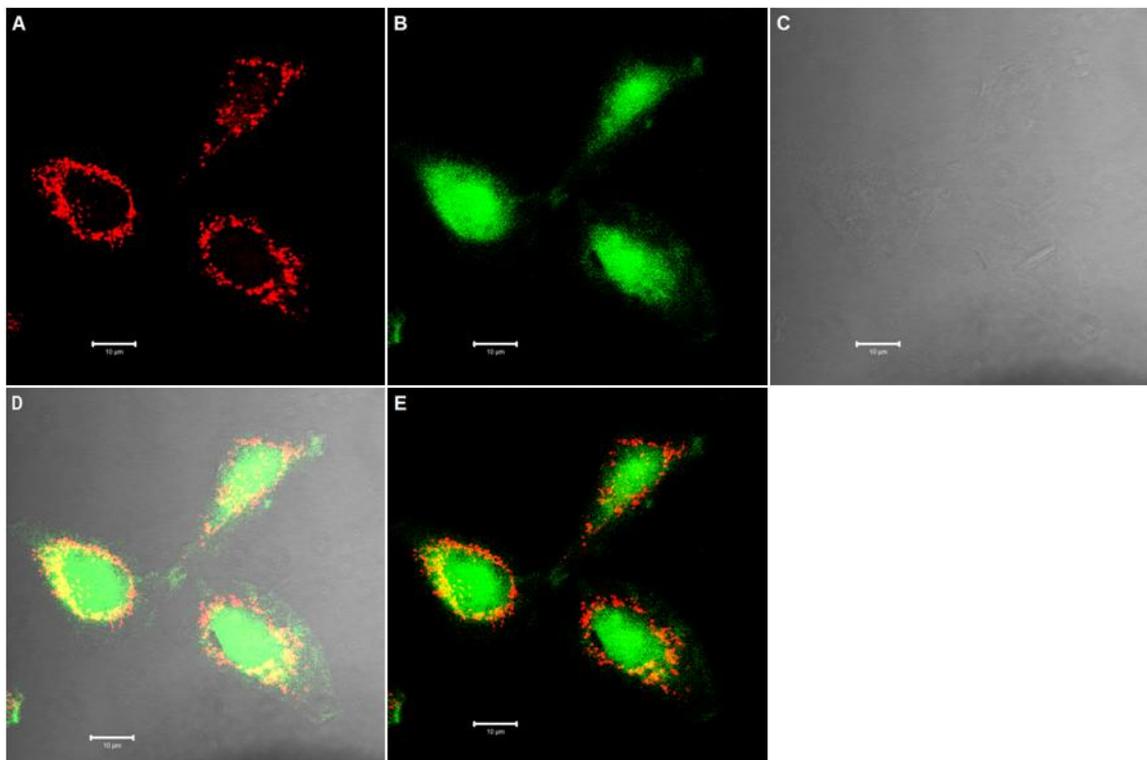


Figura 4-6. Localização intracelular de Ro: Microscopia confocal de células HeLa tratadas com 1 μ M Ro e 25 nM de Mitotracker Orange. Canais A e B conforme descrito na Tabela 3-2. Painel A: canal de MitoTracker, *pinhole*: 240 μ m, laser: 543 nm a 56%, registro de emissão de 565 a 587 nm; Painel B: canal de Ro, *pinhole*: 240 μ m, laser: 488 nm a 51%, registro de emissão de 672 a 704 nm; Painel C: luz transmitida, laser: 488 nm a 51%; Painel D: somatória dos canais A, B. e C; Painel E: somatória dos canais A e B.

Resultados

Notamos aqui que esses experimentos foram realizados apenas uma vez para cada corante. Entretanto, em cada ensaio, vários campos representando pelo menos 50 células distintas foram analisados. As imagens apresentadas são representativas de todos os campos analisados.

Com estes experimentos, portanto foi possível mostrar que, de fato, os corantes AM e CV têm localização citoplasmática, com grande localização mitocondrial, e o corante Ro é localizado difusamente pela célula, provavelmente, inclusive no núcleo e na mitocôndria.

4.1.3. GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

Uma vez demonstrado que os corantes utilizados apresentavam localização intracelular específica, determinamos se esses corantes estavam gerando oxigênio singlete intracelular durante a fotossensibilização. Para isso, utilizamos um sequestrador intracelular de oxigênio singlete, o DADB, com metodologia desenvolvida pelo laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ-USP. O DADB é relativamente estável em condições ambientes, exceto pelo fato de ser convertido no seu endoperóxido, o DADBO₂, quando exposto à luz na região do azul. Quando o DADB reage com oxigênio singlete, ele é também convertido a DADBO₂. Este endoperóxido é estável e pode ser isolado das células, detectado e quantificado por HPLC acoplado a espectrometria de massas, conforme descrito. Para a quantificação do endoperóxido DADBO₂ é usado outro endoperóxido estável como padrão interno, o DPAO₂.

Os resultados da quantificação de oxigênio singlete em células HeLa tratadas com AM e CV são mostrados na Figura 4-7. Os dados correspondem à área corrigida pelo padrão interno dos picos da análise por HPLC/MS-MS-MS dos lisados

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

celulares de células tratadas por 3 h com o captador e então submetidas ao tratamento oxidativo. Não foi possível analisar as amostras tratadas com Ro, pois o comprimento de onda usado para fotossensibilizar o corante também converte o captador em seu endoperóxido. Desta maneira, a quantidade de endoperóxido encontrada em células submetidas à iluminação com a lâmpada para o Ro foi muito mais alta que as observadas para os corantes AM e CV. A média da área dos picos de um experimento feito em triplicata sem adição de Ro com irradiação com LED azul por 10 minutos com irradiação de 1,48 J/cm² foi 1,13x10⁶ (dados não apresentados), sendo que o maior valor de área corrigida mostrado na Tabela 3-3 para células tratadas com 25 µM de AM e 10 min de fotoativação foi de 1,7x10⁵.

Os resultados apresentados na Tabela 3-3 mostram que o AM induz a formação de oxigênio singlete de maneira dependente da dose do corante e da quantidade de luz. Por outro lado, o CV induz a formação de quantidades bastante menores de oxigênio singlete, também de maneira dependente da quantidade de luz aplicada. Entretanto, não observamos um aumento significativo na produção de oxigênio singlete de maneira dependente de dose do corante. Esses resultados estão em acordo com dados *in vitro* que indicam que o rendimento quântico para oxigênio singlete do AM é maior do que do CV (82).

Resultados

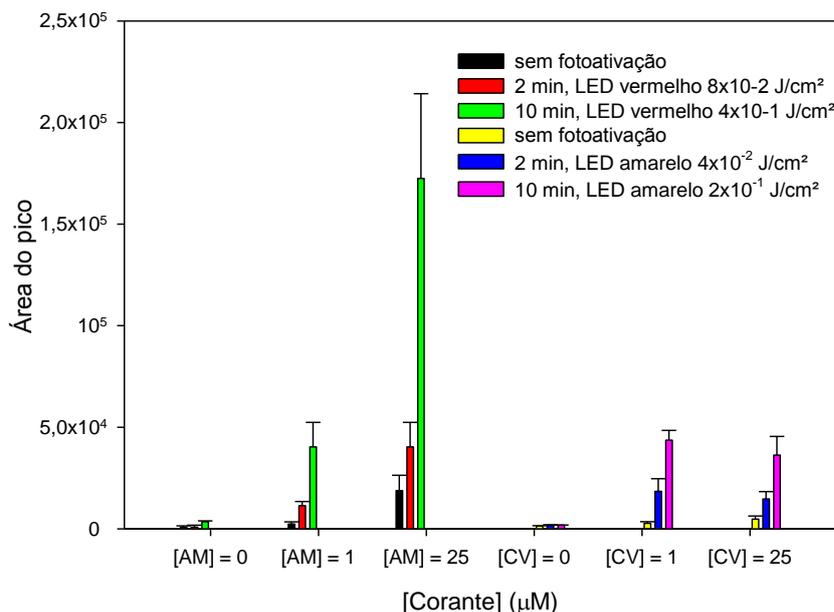


Figura 4-7. Oxigênio singlete gerado nos tratamentos com AM e CV: Quantificação por HPLC-MS de DADBO2 acumulado em células tratadas com DADB e AM ou CV. As células são tratadas como captador por 3 h e então com AM ou CV por 30 min, lavadas 2x com PBS fotoativadas pelos tempos indicados. O captador é isolado e submetido a HPLC-MS. Resultados apresentados representam a média + desvio de 1 experimento, realizado em quadruplicata.

4.2. Toxicidade

Os experimentos anteriores foram realizados para caracterizar o modelo celular quanto à localização diferencial dos agentes indutores de estresse oxidativo. Uma vez que os resultados estabeleceram claramente que AM/CV têm localização citosólica, inclusive mitocondrial, enquanto Ro tem localização difusa, e que nessas condições experimentais há formação de oxigênio singlete, passamos a estudar a citotoxicidade desses compostos em células HeLa. Para tal foram feitos experimentos de avaliação de proliferação celular em 24 h após os tratamentos oxidantes e de morte celular.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

4.2.1. PROLIFERAÇÃO

Danos ao DNA podem causar parada no ciclo celular ou, em casos mais extremos, morte celular. A medida de proliferação celular mostra diferenças na velocidade de crescimento celular após o tratamento, indicando, uma possível parada no ciclo celular quando diminuída.

Na Figura 4-8 é mostrada a proliferação de células HeLa tratadas com concentrações crescentes de AM no escuro, ou irradiadas por 2 min. É possível notar uma diminuição na velocidade de crescimento das células de maneira dependente de dose, até a parada completa da proliferação celular com 25 μM de AM. A maior concentração utilizada, 50 μM , apresentou proliferação negativa, ou seja, diminuição na quantidade de células devido à morte e descolamento das células do substrato. O gráfico também demonstra que não há inibição significativa de proliferação no escuro, indicando que os efeitos citostáticos são devidos à formação de oxigênio singlete.

Resultados

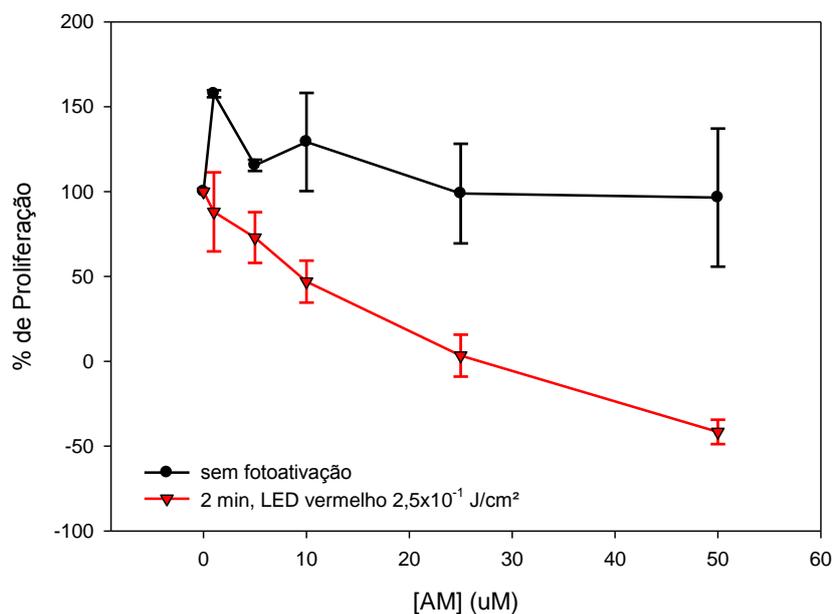


Figura 4-8. Proliferação em 24h de HeLa após tratamento com AM e fotoativação: Porcentagem de proliferação em 24 h das células tratadas por 30 min com AM e fotoativadas por 2 min. ($2,5 \times 10^{-1} \text{ J/cm}^2$) após 24 h de incubação em DMEM completo. Resultados apresentados são média \pm desvio de 2 experimentos (escuro) ou 3 experimentos (2 min), realizados em triplicata.

A Figura 4-9 mostra a proliferação em 24 h de células HeLa tratadas com CV e fotoativadas. Nesse gráfico observamos diminuição da proliferação dependente de dose em ambas as condições experimentais, ou seja, no escuro ou após a irradiação por 2 min. Isto indica que o mecanismo citostático de CV não depende da geração de oxigênio singlete, e portanto não está diretamente associado à formação de lesões oxidativas em alvos celulares pela fotoativação do corante.

**Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete**

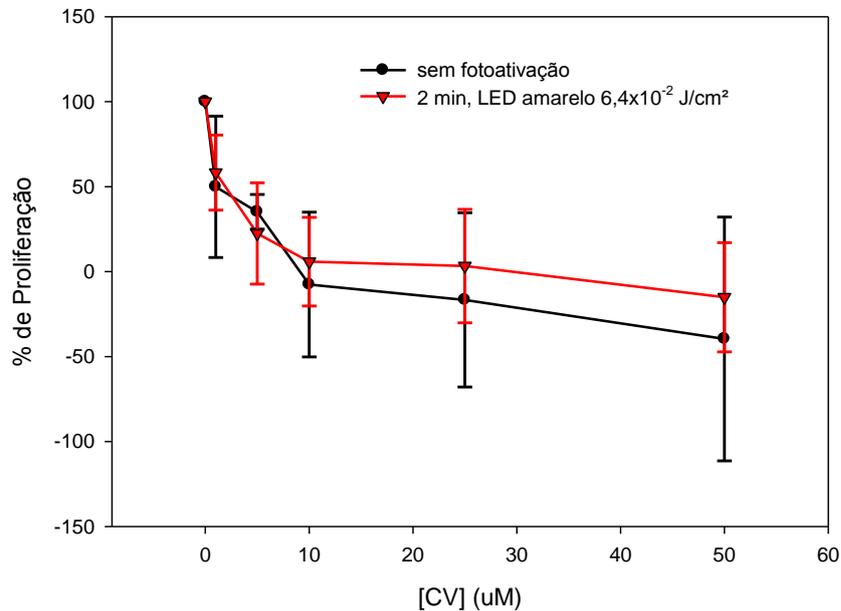


Figura 4-9. Proliferação em 24h de HeLa após tratamento com CV e fotoativação: Porcentagem de proliferação das células tratadas por 30 min com CV e fotoativadas por 2 min ($6,4 \times 10^{-2}$ J/cm²) após 24 h de incubação em DMEM completo. Resultados apresentados são média \pm desvio de 3 experimentos, realizados em triplicata.

A Figura 4-10 mostra a proliferação de células HeLa tratadas com Ro. A toxicidade no escuro deste corante foi baixa e as células fotoativadas apresentaram diminuição dose-dependente da velocidade de crescimento, como observado para o AM, indicando que o efeito citostático é dependente da geração de oxigênio singlete.

Resultados

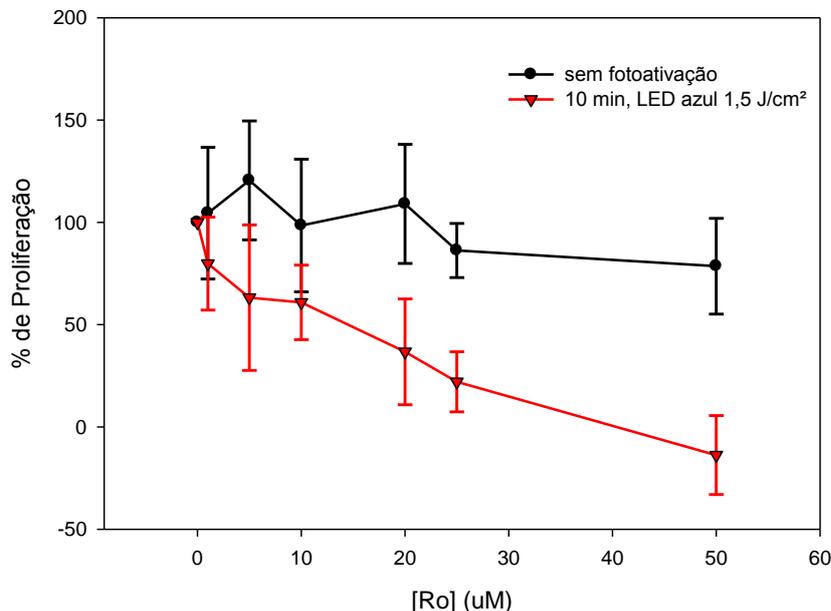


Figura 4-10. Proliferação em 24h de HeLa após tratamento com Ro e fotoativação: Porcentagem de proliferação das células tratadas por 30 min com Ro e fotoativadas por 10 min (1,5 J/cm²) após 24 h de incubação em DMEM completo. Resultados apresentados são média \pm desvio de 3 experimentos, realizados em triplicata.

Em conjunto, esses resultados indicam que os corantes AM e Ro causam inibição do crescimento celular por mecanismos dependentes da geração de oxigênio singlete durante a fotossensibilização. Por outro lado, o corante CV causa diminuição de velocidade de crescimento mesmo não fotoativado, indicando mecanismos independentes de oxigênio singlete.

4.2.2. SOBREVIVÊNCIA

A geração de estresse oxidativo pode causar tanto a parada do ciclo celular, quanto a morte celular, se a quantidade de lesões exceder a capacidade de reparo das células. Nos resultados apresentados acima, observamos proliferação negativa em concentrações mais altas dos 3 corantes, indicando perda celular. Portanto, decidimos investigar o mecanismo de morte celular utilizando o ensaio clonogênico.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

Esse ensaio avalia diretamente a perda da capacidade replicativa das células, uma vez que mede a formação de colônias a partir de células individualizadas.

Inicialmente usamos células semeadas a densidade celular baixa, 500 células por placa de 10 cm de diâmetro, e então expostas às soluções dos corantes. A Figura 4-11 mostra a sobrevivência de células HeLa tratadas com AM e CV em baixa densidade celular. É possível notar que não houve morte das células tratadas com AM, enquanto o tratamento com CV induziu morte celular dependente de dose. Nesses experimentos não realizamos os controles sem fotoativação com CV, assim não é possível analisar se a morte observada foi causada ou não pela fotoativação.

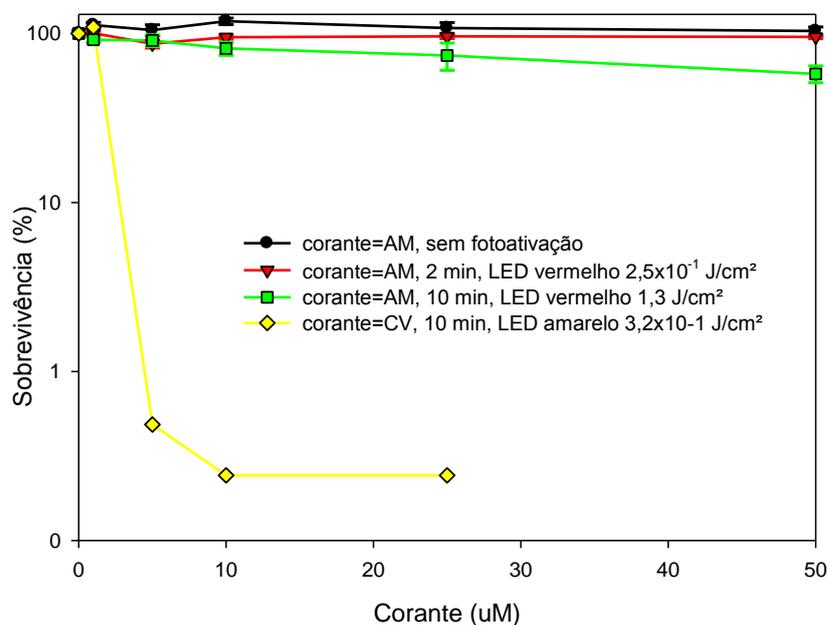


Figura 4-11. Sobrevivência clonogênica de células HeLa: Sobrevivência de células HeLa tratadas com AM ou CV. Foram semeadas 500 células em placas de 60 cm² até fixação e então tratadas com AM ou CV por 30 min e fotoativadas conforme indicado. Células incubadas por 7-10 dias, fixadas e coradas. Os resultados apresentados são média \pm desvio de 2 experimentos independentes em triplicata, exceto para o experimento com CV, que é o resultado de um experimento.

Neste experimento foram usados cerca de 5 mL de solução de corante por placa. Isso representava uma alta quantidade de corante por célula. Resultados da

Resultados

literatura (82) indicam que, em altas concentrações, o AM pode formar dímeros. O dímero de AM é incolor e não absorve luz vermelha e, conseqüentemente, nas condições deste experimento, não gera oxigênio singlete.

Dessa forma, modificamos o protocolo experimental para que as condições de tratamento não induzissem a formação de dímeros. Nesse novo protocolo experimental, $1,0 \times 10^5$ células eram incubadas com 1 mL das soluções dos corantes, e após o tratamento semeadas em baixa densidade para a formação de colônias. Com esta modificação no modelo de ensaio a proporção AM/célula foi tal que foram observadas respostas atribuídas à fotoativação do corante.

A Figura 4-12 mostra a sobrevivência de células HeLa tratadas com AM e fotoativação. Células tratadas com 50 μ M AM e fotoativadas por 10 min não formaram colônias e o resultado não pode ser mostrado no gráfico, devido à escala logarítmica. Similar ao que foi encontrado para a inibição de proliferação celular, não observamos morte celular significativa no escuro. Por outro lado, em amostras irradiadas, observamos morte celular proporcional à dose de AM e à dose de luz usada. Esses resultados corroboram os obtidos anteriormente, de que o efeito tóxico do AM é exclusivamente associado à geração de oxigênio singlete durante a fotossensibilização.

Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete

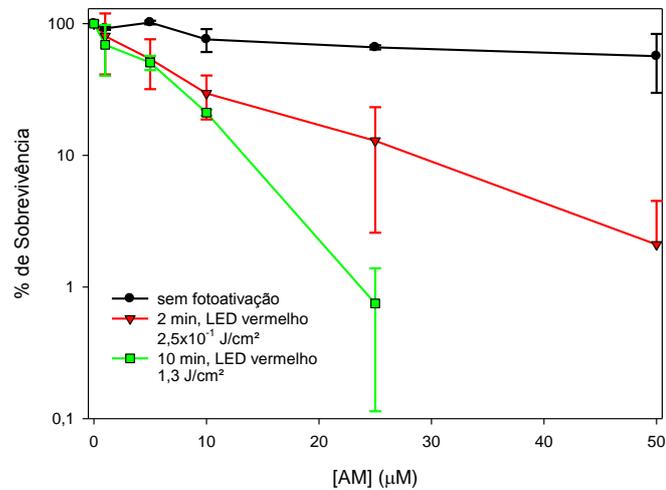


Figura 4-12. Sobrevivência de HeLa tratada com AM: Porcentagem de sobrevivência de células tratadas por 30 min com AM no escuro, ou fotoativadas com LED vermelho por 2 ou 10 min (0,25 e 1,3 J/cm², respectivamente), em relação às células não tratadas com corantes. Por ser um gráfico com escala logarítmica, não é mostrado o ponto [AM]=50 µM para células fotoativadas por 10 min, condição na qual não foram observadas colônias. Resultados apresentados são média ± desvio de 2 experimentos, realizados em triplicata.

Na Figura 4-13 é mostrada a sobrevivência de células HeLa tratadas com CV. Embora células não fotoativadas apresentem diminuição da sobrevivência (morte celular) quando tratadas com concentrações mais altas do corante, é mostrado que a fotoativação tem efeito na sobrevivência celular principalmente em concentrações mais baixas, uma vez que nessas concentrações (ate 25 µM) observamos pouca citotoxicidade no escuro, e maior citotoxicidade nas amostras irradiadas, indicando que, pelo menos parcialmente, o mecanismo citotóxico de CV depende da formação de oxigênio singlete.

Resultados

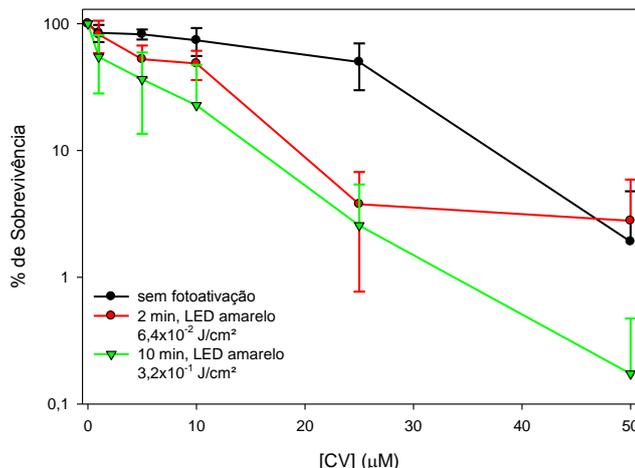


Figura 4-13. Sobrevivência de HeLa tratada com CV: Porcentagem de sobrevivência de células tratadas por 30 min com CV no escuro ou fotoativadas por LED amarelo por 2 ou 10 min ($0,064$ e $0,32$ J/cm^2 , respectivamente) em relação às células não tratadas com corantes. Resultados apresentados são média \pm desvio de 3 experimentos, realizados em triplicata.

Na Figura 4-14 é mostrada a sobrevivência de células HeLa tratadas com Ro. Não observamos morte celular no escuro, ou em culturas irradiadas por até 10 min. Nessas mesmas condições experimentais observamos inibição significativa da proliferação celular (Figura 4-10). Entretanto, devido à mudança de conjunto de LEDs, observamos que as doses de luz utilizadas nos dois experimentos foram distintas (para 10 min de irradiação, $1,5$ J/cm^2 no experimento de proliferação e $0,85$ J/cm^2 no experimento de morte celular). A dosagem da energia fornecida por cada LED foi feita depois da realização destes experimentos, e por isso não foram usadas doses equivalentes. Por esse motivo, realizamos uma nova curva de morte celular com células tratadas com Ro e irradiadas por 30 min, o que representa uma dose de luz de $2,5$ J/cm^2 . Nessa condição observamos morte celular dependente de concentração de corante. De maneira similar ao que foi observado para AM, a concentração de 50 μM causou 100% de morte celular, o que não pôde ser colocado no gráfico em escala logarítmica.

**Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete**

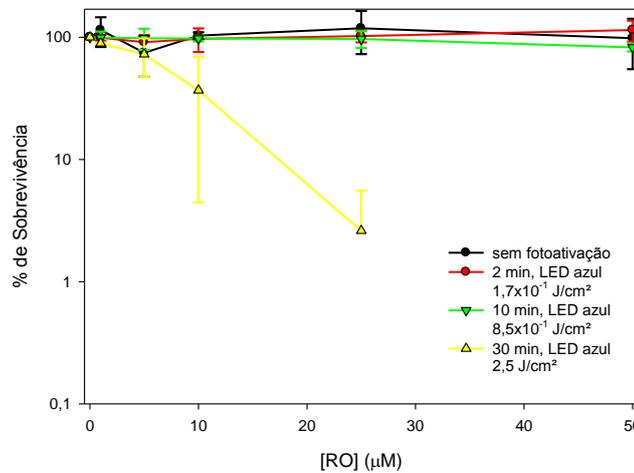


Figura 4-14. Sobrevivência de HeLa tratada com Ro: Porcentagem de sobrevivência, relativa as células controle, de células tratadas por 30 min com Ro e fotoativadas por LED azul por 0, 2, 10 ou 30 min (0, 0,17, 0,85 e 2,5 J/cm², respectivamente). Por ser um gráfico com escala logarítmica, não é apresentado o ponto [Ro]=50 μM para células fotoativadas por 10 min, condição na qual não foram observadas colônias. Resultados apresentados representam a média \pm desvio de 3 experimentos, realizados em triplicata.

4.2.3. ENSAIO DO COMETA

O objetivo desse estudo é investigar o papel do mtDNA no mecanismo citotóxico de agentes que geram estresse oxidativo, o que motivou a escolha de corantes com localização intracelular distinta, como caracterizado acima. Nós propomos que, nessas condições, os efeitos celulares seriam devidos ao acúmulo de lesões oxidativas apenas no mtDNA e não no nDNA. Entretanto, dados da literatura indicam que, em algumas condições experimentais, a indução de estresse oxidativo mitocondrial leva à formação de lesões oxidativas no nDNA, provavelmente devido à difusão de peróxido de hidrogênio. Portanto, foi necessário investigarmos a formação de lesões no nDNA em células tratadas com AM, ou seja, na condição em que esperamos que haja apenas formação de lesões oxidativas no mtDNA. Para isso, realizamos o ensaio do cometa, em que células são fixadas em agarose, têm suas paredes rompidas e são submetidas a eletroforese em condições alcalinas, nas quais sítios abásicos são convertidos em quebras de fita simples de DNA. A quebra

Resultados

no DNA faz com que os fragmentos menores gerados migrem mais rapidamente do que o DNA intacto durante a corrida eletroforética. Assim, após fixação e coloração com brometo de etídeo é possível diferenciar células que não continham níveis significativos de danos ao DNA, que apresentam núcleos intactos aproximadamente circulares, daquelas células com quebras de DNA, nas quais os fragmentos de DNA apresentam um formato similar a um cometa, daí o nome do ensaio.

A Figura 4-15 apresenta a média do *Olive Tail Moment* (OTM), um parâmetro da análise do software KOMET 6.0, de um experimento independente analisado em duplicata. Esse parâmetro representa o produto da quantidade de DNA na cauda e a distância média da migração na (89). Em todas as condições experimentais utilizadas, observamos que o AM não induziu danos significativos no nDNA, em contrapartida ao tratamento das células com peróxido de hidrogênio (controle positivo), que induziu um aumento significativo no índice OTM quando comparado com células não tratadas.

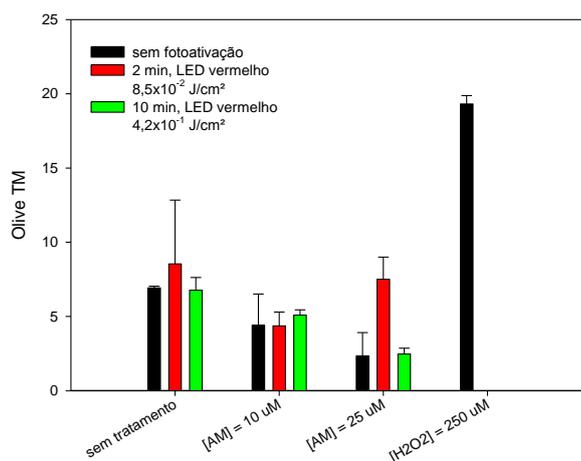


Figura 4-15. Análise de ensaio cometa de celular HeLa tratadas com AM e peróxido de hidrogênio: Os resultados apresentados são a média \pm desvio de um experimento biológico, realizado em duplicata. Para cada ponto experimental foram analisados 50 núcleos, totalizando 100 por condição.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

4.2.4. INDUÇÃO DE APOPTOSE PELOS CORANTES

Uma vez caracterizado que os modelos celulares utilizados nesse estudo induzem danos oxidativos em compartimentos intracelulares específicos, investigamos o mecanismo de morte celular induzido nas condições experimentais empregadas. A morte celular pode ocorrer por 3 mecanismos distintos, apoptose, necrose e autofagia, mas que apresentam alguma sobreposição quanto aos eventos moleculares característicos. No entanto, a fragmentação internucleossomal do DNA nuclear é um evento tardio, observado apenas em células em processo de apoptose. Esse processo resulta da ativação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} , que são ativadas apenas em decorrência da cascata de ativação de caspases (69). Portanto, escolhemos detectar esse evento para identificar se as células expostas aos corantes fotoativados estão em processo de morte celular apoptótica ou não.

Para a realização desses experimentos, as culturas foram tratadas como descrito anteriormente, com a modificação de que ao final da irradiação o PBS foi removido e foi adicionado meio completo. As células foram então incubadas por 24 h antes de serem recolhidas para a análise. Esse tempo permite que os eventos apoptóticos aconteçam e que possamos detectar um evento tardio, como a fragmentação internucleossomal do DNA.

Resultados

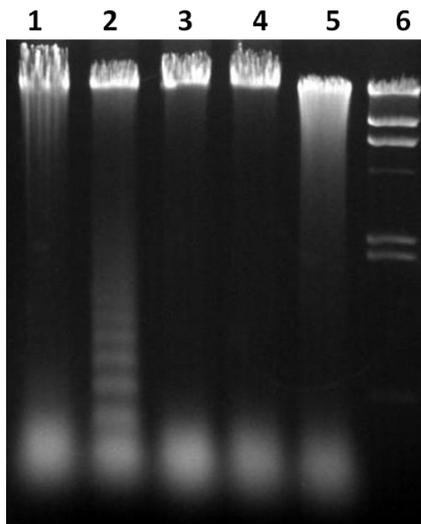


Figura 4-16. Eletroforese do DNA isolado de células tratadas com AM e A23187: Foram usados 1g de amostra de DNA isolado de 1: células HeLa, 2: células HeLa tratadas com 10 μM A23187, 3-5: células HeLa tratadas com 20 μM AM 3: sem fotoativação, 4: fotoativadas por 2 min com LED vermelho com 0,25 J/cm^2 , 5: fotoativadas por 10 min com LED vermelho com 1,27 J/cm^2 e 6: marcador de peso molecular de DNA λ -Hind-III sendo as bandas (de cima para baixo) referentes a: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 e 2.027 pares de bases.

A Figura 4-16 apresenta um gel de agarose em que foi carregado DNA obtido de células tratadas com AM e com o ionóforo de Ca^{2+} A23187, que induz morte celular apoptótica e foi usado como controle positivo. O padrão de migração em bandas distintas observado no DNA das células tratadas com A23187 é característico da fragmentação internucleossômica que ocorre durante a fase de execução de apoptose. Não observamos fragmentação internucleossômica em nenhuma dose de fotoativação para a concentração de AM utilizada. Na dose mais alta (1,27 J/cm^2) observamos um "arraste" do DNA, que, no entanto, não apresenta nenhum padrão de fragmentos distinto. Esse resultado indica que, nessas condições experimentais, o tratamento com AM não induz morte celular apoptótica, e em concentrações mais altas, a fragmentação do DNA observada é, provavelmente, resultado da degradação celular durante o processo de necrose.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

4.3. Estudo de clones HeLa $\rho^{-/0}$

Espécies reativas de oxigênio podem reagir com praticamente todos os tipos de biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Nesse sentido, o oxigênio singlete reage bastante eficientemente com as bases do DNA, e em especial com a guanina (93), mas também com lipídios (94;95). Dessa forma, para entendermos o mecanismo citotóxico de agentes que geram oxigênio singlete é importante podermos separar os efeitos do acúmulo de lesões oxidativas no mtDNA do acúmulo dessas lesões em outras biomoléculas. Portanto, para investigar diretamente o papel de lesões oxidativas no mtDNA geramos linhagens celulares $\rho^{-/0}$, ou seja, células que contêm mitocôndrias mas não contêm mtDNA ou contêm menos cópias de mtDNA. Essa condição é alcançada pelo subcultivo das células em concentrações crescentes de EtBr, que inibe seletivamente a DNA polimerase mitocondrial, pol γ (96), levando a perda parcial (ρ^{-}) ou total (ρ^0) dos genomas mitocondriais (97).

Células de mamíferos $\rho^{-/0}$ apresentam mitocôndrias, que, no entanto, não são funcionais quanto ao transporte de elétrons e fosforilação de ATP. Essas mitocôndrias mantêm um baixo potencial de membrana, à custa da hidrólise de ATP e transporte de prótons para o espaço intermembrana, pela ATP sintase (97;98). Entretanto, as células crescem a velocidades comparadas com células normais desde que o meio de cultura seja suplementado com piruvato e uridina.

Resultados

4.3.1. Q-PCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTDNA

Para a geração de células HeLa $\rho^{-/0}$, as culturas foram cultivadas na presença de EtBr, como descrito na seção 3.11. Para verificarmos a condição dos clones selecionados quanto aos níveis de mtDNA, isolamos DNA total de células WT e dos clones. Este DNA foi quantificado e submetido a q-PCR com dois pares de *primers* separados: um para um fragmento mitocondrial e um para um fragmento de gene nuclear de cópia única. Desta forma é possível obter uma quantificação relativa de mtDNA em relação à quantidade de nDNA.

Na Figura 4-17 é mostrada a relação entre as ampliações absolutas do fragmento mitocondrial e do fragmento nuclear de células HeLa WT e de um dos clones de HeLa gerados. Todos os clones gerados e avaliados apresentaram amplificação do fragmento mitocondrial, indicando que nenhum deles estava ρ^0 . O clone 3 apresentou amplificação relativa de mtDNA de aproximadamente a metade daquela observada para células HeLa WT. Por apresentar menor proporção de mtDNA/nDNA dentre os clones gerados, o Clone 3 foi escolhido para os experimentos seguintes e será deste ponto em diante chamado apenas HeLa ρ^{-} .

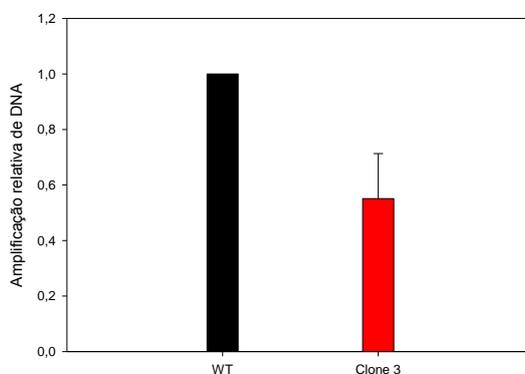


Figura 4-17. qPCR de DNA de células HeLa e do clone 3 obtido após crescimento em EtBr: razão ΔCt mtDNA/nDNA de células cultivadas em presença de EtBr (clone 3), relativa ao ΔCt mtDNA/nDNA de células normais (WT). Os resultados apresentados são a média \pm desvio da média de 2 experimentos independentes, realizados em triplicata

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

4.3.2. SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS ρho^- AO TRATAMENTO OXIDATIVO

Uma vez obtidas células com menos cópias do mtDNA, realizamos experimentos de sobrevivência frente aos tratamentos com AM e Ro para verificar se o mtDNA representa um alvo intracelular importante na indução de morte celular por esses dois corantes.

Os resultados para células tratadas com AM são mostrados na Figura 4-18 abaixo. As células identificadas como não fotoativadas estavam em uma placa de 6 poços, e a sua proteção da fotoativação foi pouco eficiente; assim, é provável que parte da morte observada seja resultado de fotoativação e parte seja devido à toxicidade do AM no escuro que, em experimento anterior mostrado na Figura 4-12, foi de aproximadamente 25% para células tratadas com 25 μM de AM.

Resultados

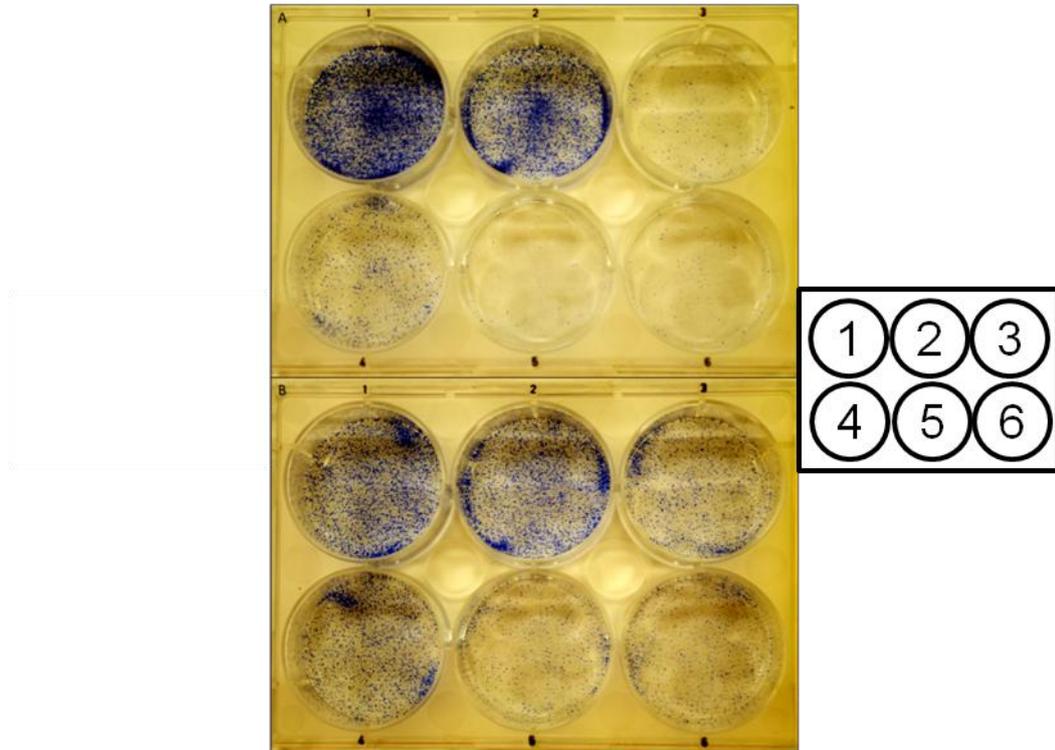


Figura 4-18. Sobrevivência de células HeLa WT e ρ^- a AM: Células HeLa WT (A) e células HeLa ρ^- (B) foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² e 24 h depois foram expostas a concentrações crescentes de AM e incubadas por 30 min. 1: sem corante; 2: 1 μ M AM; 3: 5 μ M AM; 4: 25 μ M AM (sem fotoativação); 5: 10 μ M AM; 6: 25 μ M AM. Após o fim do tratamento as culturas foram lavadas 1x em PBS e expostas a LED vermelho (em PBS) por 30 min (1,3 J/cm²). Após a fotoativação as culturas foram tripsinizadas e 5.000 células de cada condição foram transferidas para uma nova placa (em duplicata). Após 4 dias de crescimento as colônias foram fixadas e coradas como descrito. Experimento representativo de dois experimentos independentes em duplicata.

A Figura 4-19 apresenta os resultados obtidos após o tratamento de células HeLa WT e ρ^- com Ro, e processadas como descrito acima.

**Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete**

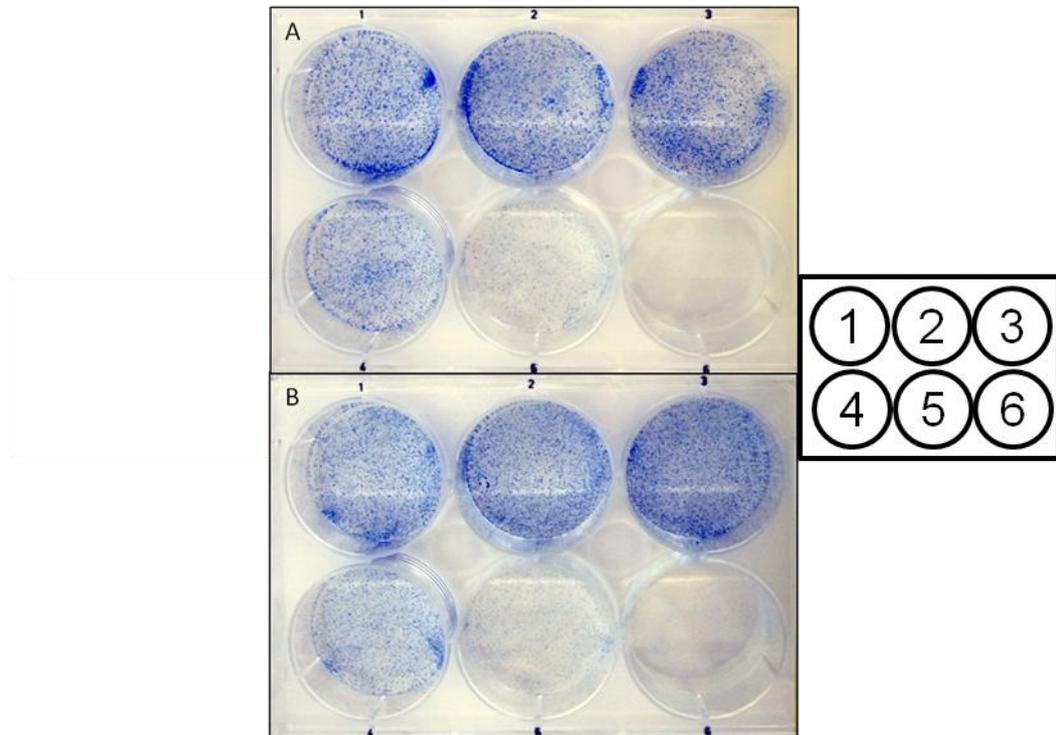


Figura 4-19. Sobrevivência de células HeLa WT e rho⁻ a Ro: Células HeLa WT (A) e células HeLa rho⁻ (B) foram semeadas a $1,12 \times 10^4$ células/cm² e 24 h depois foram expostas a concentrações crescentes de AM e incubadas por 30 min. 1: sem corante; 2: 0,5 μ M Ro; 3: 1 μ M Ro; 4: 5 μ M Ro; 5: 10 μ M Ro; 6: 25 μ M Ro. Após o fim do tratamento as culturas foram lavadas 1x em PBS e expostas a LED azul (em PBS) por 30 min (2,5 J/cm²). Após a fotoativação as culturas foram tripsinizadas e 5000 células de cada condição foram transferidas para uma nova placa (em duplicata). Após 4 dias de crescimento as colônias foram fixadas e coradas como descrito. Experimento representativo de dois experimentos independentes em duplicata.

Os resultados apresentados nas figuras acima indicam que células com menos mtDNA foram mais resistentes ao tratamento oxidativo induzido por AM que células WT e foram igualmente sensíveis a tratamento com Ro. A confirmação destes dados indicativos aponta para a participação de danos oxidativos ao mtDNA na morte de células HeLa tratadas com AM.

5. Discussão

O estabelecimento da sequência de eventos moleculares que culmina com a morte de células tem muitas implicações importantes, tanto do ponto de vista puramente científico quanto do ponto de vista clínico, para o desenvolvimento direcionado de procedimentos terapêuticos e/ou preventivos. Dentre os processos que causam morte celular, estresse oxidativo é uma alteração comum a muitos, e que se acredita representar o ponto de convergência de seus mecanismos de toxicidade. Dessa forma, determinar quais os alvos celulares cruciais para a morte celular induzida por estresse oxidativo é um dos principais desafios da pesquisa na área biomédica atual.

Nesse sentido, identificar os alvos celulares mais importantes de EROs representa um grande desafio, uma vez que essas espécies reagem com praticamente todas as biomoléculas, e muitas vezes com velocidades próximas a sua velocidade de difusão. Dessa forma, praticamente todas as estruturas intracelulares são alvos do ataque de EROs; mas a questão de qual alvo é mais importante para o comprometimento da viabilidade ainda não foi esclarecida.

Nesse trabalho, nós propusemos investigar qual o papel do mtDNA na morte celular induzida pelo estresse oxidativo. Nossa abordagem inicial foi estabelecer um modelo em que pudéssemos induzir lesões oxidativas somente no genoma mitocondrial e comparar essa situação com aquela em que ambos os genomas mitocondrial e nuclear eram oxidados. Essa abordagem apresenta uma dificuldade técnica significativa devido ao fato de que algumas EROs, como H_2O_2 , difundem facilmente através de membranas biológicas. Por isso, procuramos por moléculas

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

que gerariam um "estresse oxidativo local" quando ativadas. Fotossensibilizadores com localização intracelular específica seriam bastante adequados para esse fim, uma vez que a geração de EROs é dependente da irradiação em comprimentos de onda específicos. Escolhemos então 3 fotossensibilizadores com características distintas; nosso interesse era encontrar moléculas que se localizassem na mitocôndria mas que excluíssem do núcleo, em contrapartida a moléculas que se localizassem em ambos.

A absorção eficiente do AM pelas células e sua localização mitocondrial, nas condições utilizadas aqui, caracterizaram essa molécula como um modelo adequado para a indução de estresse oxidativo intramitocondrial. A divergência entre os dados da literatura e os resultados apresentados por nós para a localização intracelular de AM pode ser devido à diferença de condições de tratamento usadas. Oliveira e colaboradores observaram que células incubadas com AM por 16 h apresentaram colocalização de AM e o marcador de lisossomos LysoTracker (82). No mesmo trabalho foi descrita a difusão de rodamina 123 causada por queda no potencial de membrana logo após a adição de AM. Este último efeito mostra que o corante interage com a mitocôndria, causando queda no potencial de membrana. Nesse contexto, é possível que a despolarização da membrana mitocondrial cause a saída do AM da organela, e por isso após 16h de exposição o corante somente seja detectado no lisossomo, diferente do que observamos após somente 30 minutos de incubação com o corante (este estudo).

As duas espécies mais comuns derivadas do AM (o leuco-AM, derivado da reação do corante com agentes redutores celulares como NAD(P)H, e o dímero do

Discussão

AM, espécie presente em soluções concentradas do corante), podem ter localização celular diferente daquelas observadas por microscopia de fluorescência, uma vez que estas duas espécies não são fluorescentes. No entanto, elas também não são fotoativadas por luz na região do vermelho, como a usada neste trabalho. Portanto, se estas espécies estiverem presentes em outros compartimentos subcelulares, não contribuirão na geração de $^1\text{O}_2$. Esta metodologia havia sido utilizada anteriormente em estudos de reparo de mtDNA (99); no entanto, não estava claro se os efeitos observados seriam devido a danos apenas ao mtDNA, daí a necessidade de realizar o estudo descrito neste texto.

A fotoativação de células tratadas com AM foi usada para gerar danos ao nDNA em diversos trabalhos (100). Também neste caso há diferenças nas condições de tratamento, sendo que nos trabalhos citados são descritos experimentos em que a solução de AM ainda estava presente durante a fotoativação. A lavagem das células após incubação usada nos experimentos garante que apenas o AM internalizado esteja disponível para a fotoativação.

Muitos protocolos já foram usados para diversos fins com AM e, ainda assim, há respostas biológicas muito diferentes. É notável que a escolha do protocolo experimental determina o sítio de formação da lesão e, portanto, a resposta celular obtida.

A formação de oxigênio singlete em quantidade proporcional à concentração de AM e ao tempo de fotoativação mostra que nas condições usadas o AM não está gerando dímero e a formação de sua forma leuco não é proporcional à concentração. Tendo em vista que a localização obtida para o AM com 25 μM foi mitocondrial, é razoável assumir que, para a faixa de concentrações de AM usadas,

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

o oxigênio singlete gerado pela sua fotoativação (Figura 4-7), tenha ocorrido fora do núcleo. A parada de crescimento (Figura 4-8) e a morte celular (Figura 4-12), descontando a toxicidade do corante no escuro, devem ser decorrentes de danos oxidativos gerados pela formação de oxigênio singlete durante a fotoativação. Foi mostrado que os eventos de morte celular observados não foram eventos apoptóticos clássicos, já que não foi observada fragmentação internucleossômica de DNA após 24 h de incubação de células tratadas em meio completo (Figura 4-16). Além disso, foi mostrado que células tratadas com AM não apresentavam níveis significativos de sítios abásicos e quebras de fita simples ou dupla no nDNA, uma vez que não detectamos a formação de cometas (Figura 4-15). Estes dados apontam para um mecanismo de morte diferente, podendo ser necrose. Este dado é inesperado, uma vez que há muitos trabalhos indicando que o aumento de EROs na mitocôndria leva a formação do MMP que, por sua vez, induz apoptose.

A maior sobrevivência de células *rho⁻* ao tratamento oxidativo com AM observado na Figura 4-18 indica que células adaptadas à depleção parcial de mtDNA tenham menor ativação do mecanismo de morte celular descrito acima.

Foi mostrado na Figura 4-2 que células HeLa tratadas segundo o protocolo descrito neste texto com o corante CV absorvem o corante de maneira proporcional à concentração dele no meio extracelular e na Figura 4-5 que localizam este corante no citosol, inclusive em parte na mitocôndria. Os níveis de oxigênio singlete detectados (Figura 4-7) para células tratadas com CV, no entanto, indicam que a geração desta espécie não é proporcional à concentração do corante. Este efeito sugere que o CV não esteja totalmente disponível para interação com O_2 , ou que a

Discussão

geração aconteça em sítios onde o captador tenha distribuição irregular. A observação de que ocorre inibição de proliferação em células tratadas com CV, mas não irradiadas (Figura 4-9), indica que a geração de 1O_2 não é a principal via de dano nestas células. A rigor, a proliferação observada para células HeLa fotoativadas teve valores absolutos maiores que aqueles observados para células não fotoativadas – embora esteja dentro da faixa de incerteza, é possível que a fotoativação tenha um pequeno efeito protetor frente ao mecanismo de parada de ciclo celular observado sem ativação. Apesar disso, na Figura 4-13 foi mostrado que houve morte celular proporcional à dose de corante (para concentrações baixas de CV) e de fotoativação (para concentrações altas de CV). O desconhecimento da natureza do mecanismo de morte independente de luz de células HeLa tratadas com CV nas condições descritas dificulta o entendimento dos efeitos observados pela fotoativação já que a geração de 1O_2 não foi proporcional à concentração do corante, mas a morte sim.

Uma vez que o objetivo deste estudo era investigar o papel de lesões oxidativas no mtDNA para a indução de morte celular, e que o CV, apesar de apresentar localização mitocondrial, mostrou pouca relação entre indução de morte celular e fotoativação, não estendemos o uso de CV aos experimentos de investigação de indução de apoptose e os experimentos com células *rho*⁻, desenhados especificamente para testar o mtDNA.

O corante Ro foi desenvolvido para ser um ansiolítico, no entanto estudos preliminares mostraram que ele tinha atividade mutagênica (88), e apresenta características de fotossensibilizador. Foi demonstrado que ele gera danos oxidativos ao nDNA de células HeLa em um método similar ao usado por nós (87).

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

Era ainda necessário, no entanto, estabelecer se as condições usadas por nós também tinham o mesmo efeito.

Apesar de ter formação de $^1\text{O}_2$ muito eficiente, segundo a literatura, o coeficiente de absorvidade molar de radiação eletromagnética do composto não é muito alto, e por isso foi difícil confirmar por medida de absorção do lisado celular a absorção do corante (Figura 4-3). Tivemos ainda, devido ao mesmo efeito, dificuldade de verificar a localização celular deste corante que, com fluorescência muito baixa, foi encontrado em toda a célula sem distribuição preferencial em compartimentos celulares específicos (Figura 4-6). Apesar da dificuldade de localização do corante, o efeito de parada de ciclo celular observado na Figura 4-10 foi proporcional à concentração, e dependente de fotoativação. Isto nos mostra que houve danos que ativam mecanismos de parada de ciclo, provavelmente danos ao nDNA, conforme observado em outras metodologias de tratamento empregando Ro. A morte celular não foi observada com doses de fotoativação de até a metade daquela usada para causar parada de ciclo celular após 24 h. Na Figura 4-14 mostramos que com dose de fotoativação de 2,5 J/cm² foi possível observar morte significativa de células HeLa tratadas com Ro, sendo que aquelas tratadas com 50 µM do corante não apresentaram colônias sobreviventes de um total de 500 células plaqueadas. A morte de células HeLa *rho*⁻ tratadas com Ro mostrada na Figura 4-19 foi comparável àquela observada para células WT, o que indica que o mecanismo de morte ativado por tratamento com Ro nas condições descritas não é dependente da presença de mtDNA.

Discussão

Os resultados apresentados neste estudo caracterizam um modelo celular para estudar o efeito de estresse oxidativo local na mitocôndria. Além disso, demonstram que lesões oxidativas ao mtDNA são suficientes para levar as células a morte, apesar de, aparentemente, sem a ativação de vias apoptóticas. Apesar de algumas evidências da literatura indicarem que o tratamento com AM causa despolarização da membrana mitocondrial interna, é importante caracterizarmos este e outros parâmetros de integridade mitocondrial nesse modelo, particularmente nas células depletadas de mtDNA, para compreendermos ainda melhor como a oxidação do mtDNA leva à morte celular.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

6. Conclusões

- Nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, os corantes AM e CV localizam majoritariamente no citosol, em especial em mitocôndrias, e excluem do núcleo. Essas moléculas geram oxigênio singlete quando fotoativadas com luz visível em comprimentos de onda específicos. Por outro lado, o corante Ro19-8022 se localiza de forma difusa pela célula. Com isso, estabelecemos um modelo celular para distinguir os efeitos biológicos da formação de lesões oxidativas no mtDNA do efeito de lesões oxidativas em ambos os genomas celulares.
- Os efeitos citostáticos e citotóxicos de AM e Ro dependem exclusivamente da fotoativação dos corantes, demonstrando que a geração de oxigênio singlete é o evento que desencadeia os eventos moleculares que levam à morte celular. Por outro lado, o CV apresenta efeitos citostáticos e citotóxicos independentes de fotoativação, sugerindo um mecanismo tóxico independente da geração de oxigênio singlete.
- Nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, a geração de estresse oxidativo mitocondrial, pelo tratamento com AM, não induz apoptose. Esses resultados sugerem que lesões oxidativas ao mtDNA não são um sinal para o início da cascata de sinalização que ativa a via apoptótica.
- Células com menor quantidade de mtDNA são mais resistentes à morte celular induzida por AM, mas não por Ro19-8022. Isso sugere que lesões oxidativas no mtDNA têm um papel fundamental na sequência de eventos

Conclusões

moleculares que leva à morte celular em condições de estresse oxidativo mitocondrial.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

7. Referências

- (1) McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006;16(14):R551-R560.
- (2) Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2012;942:157-83.
- (3) Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012;148(6):1145-59.
- (4) Nass S, Nass MM. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol* 1963;19:613-29.
- (5) Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 1963;19:593-611.
- (6) Jansen RP. Origin and persistence of the mitochondrial genome. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 2:1-10.
- (7) Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 1998;396(6707):133-40.
- (8) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
- (9) Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;23(2):147.
- (10) Fernandez-Vizarra E, Berardinelli A, Valente L, Tiranti V, Zeviani M. Nonsense mutation in pseudouridylate synthase 1 (PUS1) in two brothers affected by myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia (MLASA). *BMJ Case Rep* 2009;2009.
- (11) Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012;379(9828):1825-34.
- (12) Cree LM, Samuels DC, Chinnery PF. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(12):1097-102.
- (13) Naviaux RK. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease. *Mitochondrion* 2004;4(5-6):351-61.
- (14) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition ed. London: Oxford University Press; 1985.

Referências

- (15) Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47(4):333-43.
- (16) Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 2010;39(8):3181-209.
- (17) Foote CS. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 1968;162(3857):963-70.
- (18) Ekert B. Effect of gamma-rays on thymine in de-aerated aqueous solutions. *Nature* 1962;194:278-9.
- (19) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* 1969;244(22):6049-55.
- (20) Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11(3):298-300.
- (21) Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* 2012;52(3):556-92.
- (22) Tiganis T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32(2):82-9.
- (23) Leonarduzzi G, Sottero B, Testa G, Biasi F, Poli G. New insights into redox-modulated cell signaling. *Curr Pharm Des* 2011;17(36):3994-4006.
- (24) Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 Sep 15;199(3):316-31.
- (25) Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 2004;36(2):363-75.
- (26) Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87(1):245-313.
- (27) Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 2007;28(5):739-45.
- (28) Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 2006;281(35):25791-802.
- (29) Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17(10):1195-214.
- (30) Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567(1):1-61.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

- (31) Aller P, Rould MA, Hogg M, Wallace SS, Doublet S. A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(3):814-8.
- (32) Moriya M, Ou C, Bodepudi V, Johnson F, Takeshita M, Grollman AP. Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat Res* 1991;254(3):281-8.
- (33) Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 2009;30(1):2-10.
- (34) Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987;327(6117):77-9.
- (35) Kalam MA, Haraguchi K, Chandani S, Loechler EL, Moriya M, Greenberg MM, et al. Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucleic Acids Res* 2006;34(8):2305-15.
- (36) Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y. Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci* 2007;98(4):465-70.
- (37) Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, et al. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 2002;12(11):912-8.
- (38) Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 2007;35(22):7466-74.
- (39) Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
- (40) Charlet-Berguerand N, Feuerhahn S, Kong SE, Ziserman H, Conaway JW, Conaway R, et al. RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J* 2006;25(23):5481-91.
- (41) Ghosh R, Mitchell DL. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res* 1999;27(15):3213-8.
- (42) Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(17):6465-7.

Referências

- (43) Anson RM, Senturker S, Dizdaroglu M, Bohr VA. Measurement of oxidatively induced base lesions in liver from Wistar rats of different ages. *Free Radic Biol Med* 1999;27(3-4):456-62.
- (44) Zastawny TH, Dabrowska M, Jaskolski T, Klimarczyk M, Kulinski L, Koszela A, et al. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Radic Biol Med* 1998;24(5):722-5.
- (45) Hamilton ML, Guo Z, Fuller CD, Van RH, Ward WF, Austad SN, et al. A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Res* 2001;29(10):2117-26.
- (46) Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41(2):99-106.
- (47) Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of beta-cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol* 2011;21(7):424-31.
- (48) Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443(7113):787-95.
- (49) Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807(6):620-5.
- (50) Prolla TA, Bohr VA, de Souza-Pinto NC. Mitochondria and aging. *Mech Ageing Dev* 2010;131(7-8):449-50.
- (51) Wanagat J, Dai DF, Rabinovitch P. Mitochondrial oxidative stress and mammalian healthspan. *Mech Ageing Dev* 2010;131(7-8):527-35.
- (52) Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem* 2006;96(3):825-32.
- (53) Tsuruya K, Furuichi M, Tominaga Y, Shinozaki M, Tokumoto M, Yoshimitsu T, et al. Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *DNA Repair (Amst)* 2003;2(2):211-29.
- (54) Lee HM, Wang C, Hu Z, Greeley GH, Makalowski W, Hellmich HL, et al. Hypoxia induces mitochondrial DNA damage and stimulates expression of a DNA repair enzyme, the Escherichia coli MutY DNA glycosylase homolog (MYH), in vivo, in the rat brain. *J Neurochem* 2002;80(5):928-37.
- (55) Xu SC, He MD, Lu YH, Li L, Zhong M, Zhang YW, et al. Nickel exposure induces oxidative damage to mitochondrial DNA in Neuro2a cells: the neuroprotective roles of melatonin. *J Pineal Res* 2011;51(4):426-33.
- (56) Lee M, Hyun D, Jenner P, Halliwell B. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

- antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2001;76(4):957-65.
- (57) Mambo E, Nyaga SG, Bohr VA, Evans MK. Defective repair of 8-hydroxyguanine in mitochondria of MCF-7 and MDA-MB-468 human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2002;62(5):1349-55.
- (58) Mambo E, Chatterjee A, de Souza-Pinto NC, Mayard S, Hogue BA, Hoque MO, et al. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. *Oncogene* 2005;24(28):4496-508.
- (59) Karahalil B, Bohr VA, de Souza-Pinto NC. Base excision repair activities differ in human lung cancer cells and corresponding normal controls. *Anticancer Res* 2010;30(12):4963-71.
- (60) Trzeciak AR, Nyaga SG, Jaruga P, Lohani A, Dizdaroglu M, Evans MK. Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* 2004;25(8):1359-70.
- (61) Souza-Pinto NC, Eide L, Hogue BA, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, et al. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. *Cancer Res* 2001;61(14):5378-81.
- (62) Ueta E, Sasabe E, Yang Z, Osaki T, Yamamoto T. Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. *Cancer Sci* 2008;99(11):2230-7.
- (63) Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776(1):86-107.
- (64) Van HF, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(10):1567-79.
- (65) Kerr JF. Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *J Pathol* 1972;107(3):217-9.
- (66) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
- (67) Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 2010;24(23):2592-602.

Referências

- (68) Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, et al. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;289:1-35.
- (69) Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct* 2011;29(6):468-80.
- (70) Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997;39(1):1-18.
- (71) Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992;55(1):145-57.
- (72) Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39(1):85-9.
- (73) Weissgerber AJ. Methylene blue for refractory hypotension: a case report. *AANA J* 2008;76(4):271-4.
- (74) Wiklund L, Basu S, Miclescu A, Wiklund P, Ronquist G, Sharma HS. Neuro- and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1122:231-44.
- (75) Floyd RA, Schneider JE, Jr., Dittmer DP. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Res* 2004;61(3):141-51.
- (76) Moore J. The Use of Methylene Blue in Gonorrhoea. *Br Med J* 1897;1(1881):140.
- (77) Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother* 2002;14(5):431-43.
- (78) Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol* 2004;79(3):227-32.
- (79) Bartlett JA, Indig GL. Effect of self-association and protein binding on the photochemical reactivity of triarylmethanes. Implications of noncovalent interactions on the competition between photosensitization mechanisms type I and type II. *Photochem Photobiol* 1999;70(4):490-8.
- (80) Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol* 1999;70(4):391-475.
- (81) Mellish KJ, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol* 2002;75(4):392-7.
- (82) Oliveira CS, Turchiello R, Kowaltowski AJ, Indig GL, Baptista MS. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic Biol Med* 2011;51(4):824-33.

***Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete***

- (83) Walker I, Gorman SA, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(7):653-9.
- (84) Docampo R, Moreno SN, Muniz RP, Cruz FS, Mason RP. Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet). *Science* 1983;220(4603):1292-5.
- (85) Baptista MS, Indig GL. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. *J Phys Chem B* 1998;102(23):4678-88.
- (86) Meniel V, Waters R. Spontaneous and photosensitizer-induced DNA single-strand breaks and formamidopyrimidine-DNA glycosylase sensitive sites at nucleotide resolution in the nuclear and mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1999;27(3):822-30.
- (87) Will O, Gocke E, Eckert I, Schulz I, Pflaum M, Mahler HC, et al. Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat Res* 1999;435(1):89-101.
- (88) Gocke E. Photochemical mutagenesis: examples and toxicological relevance. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20(4):285-92.
- (89) Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990;122(1):86-94.
- (90) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
- (91) Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758(8):994-1003.
- (92) Kweon SM, Kim HJ, Lee ZW, Kim SJ, Kim SI, Paik SG, et al. Real-time measurement of intracellular reactive oxygen species using Mito tracker orange (CMH2TMRos). *Biosci Rep* 2001;21(3):341-52.
- (93) Ribeiro DT, De Oliveira RC, Di Mascio P, Menck CF. Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a single-stranded shuttle vector replicated in monkey cells. *Free Radic Res* 1994;21(2):75-83.
- (94) Uemi M, Ronsein GE, Miyamoto S, Medeiros MH, Di Mascio P. Generation of cholesterol carboxyaldehyde by the reaction of singlet molecular oxygen [O₂ (1Δ_g)] as well as ozone with cholesterol. *Chem Res Toxicol* 2009;22(5):875-84.
- (95) Miyamoto S, Martinez GR, Martins AP, Medeiros MH, Di Mascio P. Direct evidence of singlet molecular oxygen [O₂(1Δ_g)] production in the

Referências

- reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxyxynitrite. *J Am Chem Soc* 2003;125(15):4510-7.
- (96) Iwamura T, Aoshima J. A compilation of analytical data from inhibition studies on DNA polymerases and some of its implications. *J Biochem* 1985;97(4):1101-10.
- (97) King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246(4929):500-3.
- (98) Jiang S, Cai J, Wallace DC, Jones DP. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* 1999;274(42):29905-11.
- (99) Anson RM, Croteau DL, Stierum RH, Filburn C, Parsell R, Bohr VA. Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 1998;26(2):662-8.
- (100) Berra, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos [tese]. São Paulo: , Instituto de Ciências Biomédicas; 2008 [acesso 2010-08-05]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-27032009-103125/>.

*Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular
induzida por geradores de oxigênio singlete*

Lista de anexos

Anexo I: Súmula curricular.

Anexo II: Costa, R. A. P.; Romagna, C. D.; Pereira, J. L.; Souza-Pinto, N. C. *The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 43, p. 25-29, 2011.

Anexo III: Romagna, C. D.; Mori, M. P.; de Souza-Pinto, N. C. Lesões oxidativas em DNA: formação, detecção, reparo e envolvimento em carcinogênese, **TRATADO DE ONCOLOGIA**, Editora Atheneu, Edição: Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff, *no prelo*.