**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

JOSÉ PEDRO FRIEDMANN ANGELI

**Hidroperóxidos de lipídios como fontes de
oxigênio molecular singlete ($O_2 [^1\Delta_g]$), detecção e
danos em biomoléculas**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
31/05/2011

JOSÉ PEDRO FRIEDMANN ANGELI

**Hidroperóxidos de lipídios como fontes de
oxigênio molecular singlete ($O_2 [^1\Delta_g]$), detecção e
danos em biomoléculas**

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

Orientador: Prof. Dr. Paolo Di Mascio

São Paulo
2011

José Pedro Friedmann Angeli

**Hidroperóxidos de lipídios como fontes de oxigênio molecular
singlete ($O_2 [^1\Delta_g]$), detecção e danos em biomoléculas**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Aos meus pais
José Mario e Rosemari,
pelo amor e incentivo incondicional.**

**A Dani,
pela paciência, compreensão (as vezes),
por me fazer buscar novos desafios
e por me fazer mais feliz**

Agradecimentos

Nossa história acadêmica, embora um permanente caminhar tem momentos de fechamento provisório. Momentos que representam o fim de um ciclo. Cada fim de ciclo é a síntese de toda nossa história, mas também uma experiência única marcada pela presença de tantos que acompanharam esta etapa específica. Pessoas e instituições que tiveram cada qual seu papel, mas que no conjunto foram indispensáveis nesta caminhada. É para estas pessoas e instituições que dirijo meus agradecimentos.

É costume começar pelo orientador. É o que faço. Não só porque ele foi o primeiro a acreditar que eu merecia a oportunidade de viver esta experiência acadêmica, mas principalmente porque seu apoio e supervisão não subtraiu a liberdade necessária para que eu ganhasse autonomia no pensar e no agir: condição indispensável na formação do pesquisador. Professor Dr. Paolo Di Mascio, muito obrigado! Hoje, tenho certeza que aprender é, antes de tudo, aprender a caminhar, a perguntar e buscar as respostas possíveis, é parar e duvidar dos caminhos escolhidos, é percorrê-los novamente, se necessário. Ao fazer-me caminhar sozinho, algumas vezes aos tropeços, pelo caminho das pedras, permitiu que eu construísse minha estrada. Estrada, que tenho certeza, continuará interpondo pedras para remover. Mas hoje, sei que posso removê-las. Quando forem muito pesadas, voltarei! Sei que sempre terei aquela “mãozinha” para alavancá-las, como sei também, que terei sua confiança de que darei conta de muitas outras.

Sou particularmente grato a Prof^a. Dra. Marisa H. G. Medeiros, que me acolheu em seu laboratório e tratou-me, sempre, como um de seus alunos. Teve um papel importantíssimo na minha formação. Minha convivência em seu laboratório me

deu a certeza de que bons resultados não acontecem facilmente e nem por acaso. Sua generosa acolhida e presença confiante nos momentos de “escuridão” ensinaram-me que aprendemos muito mais do que aquilo que ansiosamente buscamos.

Agradeço a Prof^a Dr^a Sayuri Miyamoto, por sempre estar disposta a me ajudar independente de qualquer coisa. Com certeza ela teve papel fundamental para o bom andamento deste trabalho.

Agradeço, muito especialmente, o Osmar F. Gomes (Charlie Brown), pela amizade, companheirismo e principalmente, por nunca ter deixado que nenhuma questão burocrática ou técnica interferisse no andamento dos trabalhos. Tenho certeza que trabalhei com um dos melhores técnicos do Instituto de Química. Isto é um privilégio.

Agradecer aos amigos é a tarefa mais delicada. Alguns estavam ali sempre, dentro ou fora do laboratório. Alguns passaram rapidamente, mas tiveram um impacto que muitas vezes nem conseguimos compreender como e porque foi. Seja como for, todos foram importantes para que eu pudesse manter o foco, o ritmo e principalmente a saúde mental. São os amigos as principais vítimas de nosso estresse, de nossas obsessões e de nossas inseguranças.

Por isso, mas também pela amizade e pelos bons momentos de descontração e pelo estímulo intelectual, agradeço aos companheiros dos laboratórios dos Professores Paolo, Marisa e Sayuri: Angelica, Henrique, Maitê, Raul, Guilherme, Isaura, Kerol, Alê (pelo auxílio nas TLCs, colunas de cromatografias.....muito obrigado!), Leticia, Agda, Fernanda Sena, Fernanda Prado, Emerson, Graziela, Patricia, Priscilla, Tathi, Rafaella, Zilda, Thiago, Simone e

Tereza. Muito embora apareçam elencados de forma impessoal, “num pacote”, saibam que cada um de vocês teve um papel singular nesta minha trajetória.

À Dr^a Marilene Oliveira, pela colaboração constante e doações, sem fim, de DADB (molécula na qual se baseou metade deste trabalho), e ao Dr. Divinomar Severino pelos auxílios fotoquímicos/fotobiológicos um obrigado muito especial.

Agradeço a Flavia, pois se ela não me tivesse “enganado”, no início, possivelmente eu não teria iniciado o meu trabalho. E, agora no final - ao dividirmos todas as tensões e angústias, mas também alegrias e esperanças - fomos como dois corredores que se apóiam mutuamente, no final da linha, para recuperar o fôlego.

Cara amiga Dr^a Camila C.M. Garcia, por tantas colaborações e principalmente, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no doutorado, muito obrigado! Sem sua ajuda e amizade quem sabe onde eu estaria, agora, batendo minha cabeça!

À minha amiga Mariana L. Duarte agradeço por te me apresentado o mundo do 2-D, e por inúmeras colaborações que nunca saíram da figura 1. Quem sabe, ainda teremos tempo para melhorar isso!

Ao meu amigo Florência P. Freitas. Terceira e quarta mão nos experimentos que levaram à formulação desta tese. Sua inteligência, disponibilidade em tantas noites e finais de semana no laboratório fazem com que este produto final também lhe pertença.

Ao meu amigo Raphael Queiroz, pelos inúmeros cafés da manhã e as diversas discussões científicas de boteco. Fico feliz de podermos “sonhar” com novas idas, caso contrário fazer ciência não seria divertido.

Não posso esquecer-me das pessoas que não participaram ativamente do processo da tese, mas que com certeza torceram para que esse dia chegasse. Agradeço meus Avôs (Lorenz e Pedro... vocês fazem muita falta aqui), minha Avós Maria e Lola (que ainda terá o prazer de ter um neto Dr... não do tipo que ela gostaria), meus Tios (Nilto, Luiz, Gigio e Ricardo) e Tia (Christina e em especial a Tia Magali por ter feito a primeira revisão desta tese!). Agradeço também a todos os meus primos (Tania, Beto, Heri, Erica, Elaine, Ricardinho, Gabriela, Marcela e Sara).

Agradeço ao meu irmão, Lourenço. Não sei bem o porquê, mas agradeço... é brincadeira Joe, você sabe que esta aqui dentro do meu coração!

Pai e Mãe, dedicar esta tese a vocês não é o suficiente. A vocês eu devo tudo. Palavras não são capazes de expressar meu sentimento de dívida. MUITO OBRIGADO por todos os sacrifícios, se não fosse por vocês com certeza eu não estaria aqui hoje. Este trabalho nada mais é do que o fruto de um trabalho que vocês começaram a mais de 27 anos atrás!

O agradecimento final dedico à FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa de doutorado que me foi concedida. Também ao CNPQ, Finep e INCT de processos redox em biomedicina – Redoxoma, pelo apoio financeiro. A impessoalidade desta referência não significa que agradeço para cumprir formalidade. Sem estas instituições não chegaria ao bom termo deste trabalho, na verdade seria impensável iniciá-lo.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

Caspar David Friedrich - No barco à vela

*"Noventa por cento do sucesso se
baseia simplesmente em insistir."*

(Woody Allen)

RESUMO

ANGELI, J.P.F. **Hidroperóxidos de lipídios como fontes de oxigênio molecular singlete ($O_2 [^1\Delta_g]$), detecção e danos em biomoléculas**. 2011. 233p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O estudo do processo da peroxidação de lipídios tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à implicação dos hidroperóxidos de lipídios (LOOH) em diversos processos patológicos. A decomposição destes LOOH é capaz de gerar subprodutos capazes de promover danos em biomoléculas, incluindo proteínas e DNA. No presente trabalho, utilizando hidroperóxidos de ácido linoléico isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18 ($LA^{18}O^{18}OH$), fomos capazes de demonstrar que estas moléculas geraram oxigênio singlete marcado [$^{18}(^1O_2)$] em células em cultura. A detecção de tal espécie foi possível através da utilização de uma nova metodologia utilizando um derivado antracênico. Para este propósito foi utilizado o derivado de antraceno 3,3'-(9,10-antracenediil) bisacrilato (DADB), cujo produto específico da reação com o 1O_2 (o endoperóxido do DADB – $DADBO_2$) do pode ser facilmente detectado por HPLC-MS/MS. De forma a expandir a compreensão dos efeitos tóxicos desses LOOH, investigamos o efeito destes compostos gerados intracelularmente. Para tal, foi utilizado o Rosa bengala (RB), um fotosensibilizador que tem afinidade por espaços apolares como membranas e lisossomos. A fotosensibilização deste composto foi capaz de induzir a morte celular, e esta morte estaria relacionada a uma maior formação de 1O_2 e a um maior acúmulo de peróxidos. Nestes estudos foi possível demonstrar que carotenóides e sistemas antioxidantes dependentes de glutathione foram capazes de proteger contra

os efeitos tóxicos da fotossensibilização na presença de RB. Adicionalmente foram avaliados os efeitos da hemoglobina (Hb) e do hidroperóxido do ácido linoléico (LAOOH) em uma série de parâmetros toxicológicos, como citotoxicidade, estado redox, a peroxidação lipídica e dano ao DNA. Nós demonstramos que a pré-incubação das células com Hb e sua posterior exposição à LAOOH (Hb + LAOOH) levou a um aumento na morte celular, a oxidação do DCFH, formação de malonaldeído e fragmentação do DNA e que esses efeitos estavam relacionados com o grupo peróxido e ao heme presentes na Hb. Foi demonstrado que as células incubadas com LAOOH e Hb apresentaram um nível maior das lesões de DNA; 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina e 1,N²-etheno-2'-desoxiguanosina. Além disso, as incubações com Hb levaram a um aumento nos níveis de ferro intracelular, e este alto nível de ferro correlacionada com a oxidação do DNA, avaliadas através da medida de sítios EndoIII e Fpg sensíveis. Nossos resultados comprovam que os LAOOHs apresentaram efeito citotóxico e genotóxico, mesmo em concentrações muito baixas, podendo contribuir para o desencadeamento de processos patológicos como o câncer e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Palavras chave: Hidroperóxidos de lipídio, oxigênio molecular singlete, hemoglobina, HPLC-MS/MS, genotoxicidade, derivados de antraceno

ABSTRACT

ANGELI, J.P.F. **Lipid hidroperoxides as singlet molecular oxygen precursors ($O_2 [^1\Delta_g]$), detection and damage to biomolecules.** 2011. 233p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The study of the process of lipid peroxidation has increased in recent years, mainly due to the involvement of lipid hydroperoxide (LOOH) in a series of pathological processes. The decomposition of LOOH is able to generate products that can promote damage to biomolecules, including proteins and DNA. In the present work, using linoleic acid hydroperoxide isotopically labeled with $^{18}O_2$ ($LA^{18}O^{18}OH$), we demonstrate that these molecules were able to generate labeled singlet oxygen [$^{18}(^1O_2)$] in cultured cells. The detection of such species was possible using a new methodology using an anthracene derivative. For this purpose we used the anthracene derivative of 3,3'-(9,10-antracendiil) bisacrilate (DADB), whose specific reaction product with 1O_2 (DADB endoperoxide – DADBO $_2$) can be easily detected by HPLC-MS/MS. In order to expand the understanding of the toxic effects of LOOH, we investigated the effect of these compounds generated intracellularly. For this purpose, we used Rose Bengal (RB), a photosensitizer that has affinity for apolar spaces such as membranes and lysosomes. The photosensitization of this compound was able to induce cell death, and this death was related to increased formation of 1O_2 and a higher accumulation of peroxides. In these studies we have shown that carotenoids and glutathione-dependent antioxidant systems were capable of protecting against the toxic effects of photosensitization in the presence of RB. Additionally, we evaluated the effects of hemoglobin (Hb) and linoleic acid

hydroperoxide (LAOOH) in a series of toxicological endpoints such as cytotoxicity, redox status, lipid peroxidation and DNA damage. We demonstrated that preincubation of cells with Hb and its subsequent exposure to LAOOH (Hb + LAOOH) led to an increase in cell death, DCFH oxidation, formation of malonaldehyde and DNA fragmentation, and that these effects were related to the peroxide and the heme group. It was demonstrated that cells incubated with LAOOH and Hb showed a higher level of the DNA lesions, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine. Furthermore, incubations with Hb led to an increase in intracellular iron levels, and this high level of iron correlates with the oxidation of DNA, measured as EndoIII and Fpg-sensitive sites. Our results show that the LOOHs showed cytotoxic and genotoxic, even at very low concentrations and may contribute to the onset of chronic malignancies like cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

Keywords: Lipid hidroperoxides, singlet molecular oxygen, HPLC-MS/MS, hemoglobin, genotoxicity, anthracene derivatives

Lista de abreviaturas

- 10-OOH-** Ácido 10-hidroperóxi-8,13-octadecadienóico
- 12-OOH-** Ácido 12-hidroperóxi-9,13-octadecadienóico
- 13-OOH-** Ácido 13-hidroperóxi-9,11-octadecadienóico
- 1,N²-propanodGuo-** 1,N²propano-2'-desoxiguanosina
- 1,N²-εdGuo-** 1,N²eteno-2'-desoxiguanosina
- ¹O₂-** Oxigênio molecular singlete
- 5α-OOH-** 3β-hidroxi-5α-colestano-6-ene-5-hidroperóxido
- 6α-OOH-** 3β-hidroxicolestano-4-ene-6α-ene-5-hidroperóxido
- 6β-OOH-** 3β-hidroxicolestano-4-ene-6β-ene-5-hidroperóxido
- 7α-OOH-** 3β-hidroxicolestano-5-ene-7α-hidroperóxido
- 7β-OOH-** 3β-hidroxicolestano-5-ene-7β-hidroperóxido
- 8-oxodGuo-** 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
- 9-OOH-** Ácido 9-hidroperóxi-10,12-octadecadienóico
- αGST-** α-Glutationa-S-transferase
- AM-** Azul de metileno
- ACR-** Acroleína
- Apo-Hb-** Apo-Hemoglobina
- BSO-** L-butionina sulfoximina
- CAT-** Catalase
- ChAld-** 3-hidroxi-5-hidroxi-β-norcolestano-6-carboxaldeído
- CL-** Cardiolipina
- CLOOH-** Hidroperóxido de cardiolipina
- CSec-** 3-hidroxi-5-oxo-5,6-secochlestando-6-al
- CRC-** Sigle em inglês para cancer colorretal
- CRT-** Crotonaldeído
- D₂O** – Água deuterada
- DADB-** dietil 3,3'-(9,10-antracenodiil) bisacrilato
- DADBO₂-** Endoperóxido do dietil 3,3'-(9,10-antracenodiil) bisacrilato

dAdo - 2'-desoxiadenosina

DCF- Diclorofluoresceína

dCyd - 2'-desoxicitosina

DDE- *Trans,trans*-2,4-decadienal

DHPN- *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-1,4-naftalenodipropanamida

DHPNO₂- Endoperóxido do *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-1,4-naftalenodipropanamida

DMN- 1,4-dimetilnaftaleno

DMNO₂- Endoperóxido do 1,4 dimetilnaftaleno

dOxa- Ácido Oxalúrico

DPA- 9,10-difenilantraceno

DPAO₂- Endoperóxido do 9,10-difenilantraceno

dGuo- 2'-desoxiguanosina

EndoIII- Endonuclease III

EPR- Sigla em inglês para - Ressonância Paramagnética eletrônica

ER- Espécies reativas

ERN- Espécies reativas de nitrogênio

ERO- Espécies reativas de oxigênio

ESI- Sigla em inglês para – ionização por eletrospray

Fpg- Formamidopirimidina DNA glicosilase

γ-GCS- γ-glutamilcisteína sintetase

GPx- Glutathione peroxidase

GSH- Gama-L-glutamil-L-cisteínil-L-glicina (glutathione reduzida)

GSSG- Glutathione dissulfeto

Hb- Hemoglobina

H₂DCF-DA-, 2',7'-diclorofluoresceína

HNE- *Trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal

HPLC- Sigla em inglês para - Cromatografia Líquida de alta eficiência

HPLC-ECD- Sigla em inglês para cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector eletroquímico

HPLC/ESI/MS-MS- Sigla em inglês para - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray e análise de massa após fragmentação da molécula selecionada

LA- Ácido linoléico

LAOOH- Hidroperóxido de ácido linoléico

L¹⁸O¹⁸OH- Hidroperóxido de ácido linoléico marcado com oxigênio-18

LH- Lipídios

LO[•]- Radical alcóxila de lipídios

LOO[•]- Radical peróxila de lipídios

LAOH- Hidróxi linoleato

LOOH- Hidroperóxido de lipídio

LOX- Lipoxigenase

MDA- Malondialdeído

MPO- Mieloperoxidase

MRM- Monitoramento de reações múltiplas

MS- Sigla em inglês para – espectrometria de massa

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NAC – N-acetilcisteína

NDPO₂- Endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato de sódio

PLA₂- Fosfolipase A2

Prx- Peroxirredoxina

PSOOH- Hidroperóxido de fosfatidilserina

PUFA- Ácidos graxos poli-insaturados

RB- Rosa bengala

rpm- Rotações por minuto

SOD- Superóxido dismutase

Trx- Tiorredoxina

TrxR- Tiorredoxina redutase

XO- Xantina oxidase

Sumario

1) Introdução

1.1) Aspectos gerais	34
1.1.1) Radicais livres e espécies reativas: terminologia	35
1.1.2) Fontes de EROs e ERNs	36
1.1.3) Reatividade, tempo de vida e difusão	38
1.1.4) Defesas antioxidantes	40
1.1.4.1) Defesas antioxidantes enzimáticas	41
1.1.4.1.1) Superóxido Dismutase	41
1.1.4.1.2) Catalase	42
1.1.4.1.3) Tiorredoxinas	42
1.1.4.1.4) Peroxirredoxinas	43
1.1.4.1.5) Glutathione Peroxidase	44
1.1.4.2) Defesas antioxidantes não enzimáticas	46
1.1.4.2.1) Glutathione	46
1.1.4.2.2) Síntese de Glutathione	46
1.1.4.2.3) Carotenóides	48
1.2) Oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$)	50
1.2.1) Tipos de reações do $^1\text{O}_2$	51
1.2.2) Oxigênio singlete em sistemas biológicos	53
1.2.3) Respostas celulares ao O_2	59
1.2.4) Detecção do $^1\text{O}_2$	62
1.2.4.1) Utilização de supressores e potenciadores	63
1.2.4.2) Detecção de $^1\text{O}_2$ através de luminescência	63
1.2.4.3) Reação de $^1\text{O}_2$ com biomoléculas: Biomarcadores	64
1.2.4.3.1) Reações com DNA	65
1.2.4.3.2) Reações com Colesterol	67
1.2.4.3.3) Reações com aminoácidos e proteínas	69
1.2.4.4) Detecção de $^1\text{O}_2$ utilizando captadores químicos	72
1.3) Peroxidação lipídica e hidroperóxidos de lipídios (LOOH)	75
1.3.1) Formação de hidroperóxidos de LOOH	75
1.3.1.1) Decomposição de LOOH	80
1.3.2) Consequências da formação e possíveis destinos de LOOH	82
1.3.3) Absorção e Translocação de ácidos graxos	85

1.3.4) LOOH sinalização e morte celular	88
1.3.5) Danos em DNA promovidos por peroxidação lipídica	91
2) Objetivos	95
3) Materiais e Métodos	96
3.1) Materiais	96
3.2) Equipamentos	97
3.3) Desenvolvimento de uma metodologia para detecção de $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares	98
3.3.1) Síntese do captador dietil 3,3'-(9,10-anthracenodiil) bisacrilato (DADB)	98
3.3.2) Síntese do endoperóxido de dietil 3,3'-(9,10-anthracenodiil) bisacrilato (DADBO ₂)	98
3.3.3) Análise dos produtos por HPLC/MS/MS	99
3.3.4) Análises espectroscópicas	100
3.3.5) Reação do DADB com diferentes espécies reativas	100
3.3.6) Estudos Celulares com DADB	101
3.3.6.1) Cultivo celular	101
3.3.6.2) Determinação da viabilidade celular (MTT)	102
3.3.6.3) Dosagem fluorimétrica de DADB incorporado	103
3.3.6.4) Localização subcelular (microscopia confocal)	103
3.3.6.5) Quantificação de DADBO ₂ em células irradiadas na presença de fotossensibilizador	104
3.3.6.5.1) Metodologia para quantificação de DADBO ₂ por HPLC/ESI/MS/MS	105
3.4) Produção de $^1\text{O}_2$ via hidroperóxidos de lipídios	106
3.4.1) Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH)	106
3.4.2) Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18 (LA ¹⁸ O ¹⁸ OH)	106
3.4.3) Purificação dos hidroperóxidos de LAOOH	107
3.4.4) Análise dos LAOOH por espectrometria de massa	108
3.4.5) Síntese de hidroxi linoleato (LAOH)	108
3.4.6) Captação de $^1\text{O}_2$ em modelos celulares	109
3.4.6.1) Preparo de extratos celulares	109
3.4.6.2) Viabilidade celular (MTT)	109

3.4.6.3) Dosagem de peróxidos (FOX assay).....	110
3.4.6.4) Detecção da geração de espécies reativas por DCFH.....	110
3.4.6.5) Análise de glutathiona.....	111
3.4.6.5.1) Tratamento das células e preparo de amostras.....	111
3.4.6.5.2) Metodologia para quantificação simultânea de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada.....	111
3.4.6.6) Quantificação de DADBO ₂ em células e extratos celulares.	113
3.4.6.7) Dosagem de proteínas.....	112
3.5) Estudo da genotoxicidade de LAOOH.....	114
3.5.1) Cultura celular.....	113
3.5.2) Determinação da viabilidade celular.....	113
3.5.3) Quantificação de MDA.....	114
3.5.4) Detecção da geração de espécies reativas por DCFH.....	115
3.5.5) Avaliação de peróxidos (FOX Assay).....	115
3.5.6) Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa).....	116
3.5.7) Isolamento de DNA celular.....	117
3.5.8) Hidrólise de DNA.....	118
3.5.9) Análise de 8-oxodGuo no DNA das células tratadas.....	119
3.5.10) Dosagem de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo.....	119
3.5.1.10.1) Método de quantificação de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² - εdGuo por HPLC/ESI/MS-MS.....	120
3.5.1.11) Determinações de Fe em lisado celular por ICP-MS.....	122
4) Resultados.....	123
4.1) Síntese e aplicação do DADB para detecção de ¹ O ₂	123
4.1.1) Síntese do DADB.....	123
4.1.2) Reação do DADB com ¹ O ₂	124
4.1.3) Reação do DADB com diferentes espécies reativas.....	128
4.1.4) Incorporação e viabilidade celular em células incubadas com DADB.....	130
4.1.5) Distribuição intracelular do DADB.....	131
4.1.6) Quantificação de DADBO ₂ em células irradiadas na presença de Rosa bengala.....	133

4.2) Efeitos celulares do $^1\text{O}_2$	136
4.2.1) Citotoxicidade de $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização.....	136
4.2.2) Geração de $^1\text{O}_2$ e formação de peróxidos.....	138
4.2.3) Efeito da glutathione na remoção de peróxidos gerados por $^1\text{O}_2$..	140
4.2.4) Efeito do Ferro no processo de decomposição de peróxidos em células fotossensibilizadas.....	141
4.2.5) Efeito protetor de carotenóides na citotoxicidade induzida por $^1\text{O}_2$	142
4.3) Geração de $^1\text{O}_2$ via hidroperóxidos.....	144
4.3.1) Síntese de LAOOH.....	144
4.3.2) Citotoxicidade dos LAOOH.....	148
4.3.3) Geração de $^1\text{O}_2$ em extratos celulares.....	149
4.3.4) Geração de $^1\text{O}_2$ em células em cultura.....	153
4.4) Avaliação da toxicidade de LAOOH em células de câncer de cólon...	157
4.4.1) Citotoxicidade dos LAOOHs em células SW480.....	157
4.4.2) Lipoperoxidação e estado redox celular.....	157
4.4.3) Genotoxicidade.....	161
5) Discussão	170
5.1) Utilização do DADB como molécula repórter para a produção de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos.....	170
5.2) Fotocitotoxicidade, formação de $^1\text{O}_2$ e peróxidos: efeito protetor de glutathione e carotenoides.....	173
5.3) Oxigênio molecular singlete como uma das espécies geradas pela decomposição de hidroperóxidos.....	177
5.4) Genotoxicidade induzida por LAOOH e efeito potenciador de fontes de ferro presentes na dieta.....	182
6) Conclusões	189
7) Perspectivas	191
8) Referências bibliográficas	192
Súmula Curricular	227

Lista de Figuras

Figura 1.1: Principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio.

Figura 1.2: Redução sequencial do oxigênio.

Figura 1.3: Relação entre tempo de vida, reatividade e difusão de diferentes espécies reativas.

Figura 1.4: Representação da síntese da molécula de glutathione.

Figura 1.5: Configuração eletrônica do O_2 .

Figura 1.6: Reação tipo ene.

Figura 1.7: Cicloadição [2+2].

Figura 1.8: Cicloadição [4+2].

Figura 1.9: Esquema de fotossensibilização.

Figura 1.10: Burst oxidativo de neutrófilos.

Figura 1.11: Decomposição do peroxinitrato.

Figura 1.12: Mecanismo de Russel.

Figura 1.13: Formação de hidroperóxidos protéicos.

Figura 1.14: Hidroperóxidos de timina.

Figura 1.15: Transdução de sinal iniciada por 1O_2 .

Figura 1.16: Oxidação da desoxiguanosina.

Figura 1.17: Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

Figura 1.18: Foto-oxidação do colesterol.

Figura 1.19: Mecanismos de formação de ChAld e Csec pela ação do 1O_2 .

Figura 1.20: Oxidação da histidina via 1O_2 .

Figura 1.21: Oxidação da tirosina via 1O_2 .

Figura 1.22: Oxidação do triptofano via 1O_2 .

Figura 1.23: Oxidação da metionina via 1O_2 .

Figura 1.24: Reação de derivados de antraceno com $^1\text{O}_2$ gerando o respectivo endoperóxido.

Figura 1.25: Abstração de H em cadeias lipídicas.

Figura 1.26: Peroxidação lipídica.

Figura 1.27: Produtos formados na oxidação do ácido linoléico pelas vias radicalares e não radicalares

Figura 1.28: Representação da reação catalisada pela enzima lipoxigenase.

Figura 1.29: Formação de malonaldeído.

Figura 1.30: Decomposição de hidroperóxidos.

Figura. 1.31: Níveis de peroxidação lipídica e respostas celulares.

Figura 1.32: Vias de redução por 1 e 2 elétrons dos LOOH.

Figura 1.33: Tipos de deslocação de LOOH.

Figura 1.34: Possíveis destinos e efeitos de LOOH translocados entre membranas.

Figura. 1.35 Esquema apresentando a liberação de citocromo-c mediada pela oxidação da Cardiolipina (em vermelho) através da atividade peroxidásica do citocromo-c. O esquema demonstra que ambos, LOOH e H_2O_2 são capazes de induzir a atividade peroxidásica do citocromo-c.

Figura 1.36: Esquema apresentado a oxidação via um elétron desencadeada pelo radical peroxíla.

Figura 1.37: Lesões em DNA promovidas pela peroxidação lipídica.

Figura 1.38: Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação.

Figura 4.1: Espectro UV-vis (a) e fluorescência (b) de DADB em ACN.

Figura 4.2: Análise HPLC/MS da síntese de DADB.

Figura 4.3: Foto-oxidação do DADB por AM em ACN (A) absorção UV-Vis do DADB e (B) Espectro de emissão de fluorescência do DADB: $\lambda_{em} = 525\text{nm}$.

Figura 4.4: Espectro de massa obtido de amostras fotossensibilizadas por 1 hora na presença de AM.

Figura 4.5: Análise HPLC/MS/MS da reação do DADB (8mM) com DMNO_2 (40mM). (A) cromatograma UV (220 nm) obtido pela seleção do ion m/z 407 antes da incubação. (B) Cromatograma obtido pela seleção do ion m/z 407 após incubação de 2h com o DMNO_2 . (C) Espectro de massa ESI^+ correspondendo ao endoperóxido (DADBO_2) obtido a 8,6 min. (D) Espectro de fragmentação do íon m/z 407 (DADBO_2).

Figura 4.6: Avaliação da reação do $^1\text{O}_2$ com diferentes espécies reativas (apresentadas na Figura). Todas as reações foram acompanhadas por 1 hora, e o consumo do captador foi monitorado pelo desaparecimento da fluorescência.

Figura 4.7: Quantificação do DADBO_2 (m/z 407/374) pelo modo MRM após reação com diferentes espécies reativas.

Figura 4.8: Quantificação de DADB em células incubadas com diferentes concentrações por 3 h (A) e por diferentes tempos com $10\mu\text{M}$. Barras representam a quantificação do DADB nos lisados celulares, enquanto as linhas são representativas da viabilidade celular avaliada pelo método do MTT.

Figura 4.9: Micrografias de células incubadas com DADB por 3 h. As imagens são representativas da população celular. A) núcleos de células V79 marcados com Syto-11 B) membranas celulares marcadas com WGA-conjugado à Alexa-678 e C) DADB. D) Sobreposição das imagens.

Figura 4.10: Cromatograma típico da quantificação do endoperóxido de DADB (DADBO_2), através de HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem no

modo MRM. Figuras a, b e c correspondem, respectivamente, a DPAO₂, DADB e DADBO₂. Painel esquerdo correspondendo a células não irradiadas e painel direito a células irradiadas na presença de RB.

Figura 4.11: Quantificação de DADBO₂ em amostras fotossensibilizadas na presença de 5μM de RB. Células foram pré-incubadas com RB por 30 min e em seguida foram lavadas e ressuspensas em PBS em H₂O ou D₂O. Células com licopeno foram tratadas por 1h com o carotenóide antes da fotossensibilização. * p < 0,05 em relação aos respectivos controles, n=3.

Figura 4.12: (A) apresenta os dados de viabilidade de células expostas a 5μM de RB e irradiadas por diferentes tempos; viabilidade foi avaliada pelo método do MTT 24h após irradiação. (B) quantificação dos níveis de glutathiona em células incubadas com 1mM de BSO e 1mM de NAC por 24h. (C) efeito de BSO e NAC na morte celular induzida por RB; células foram pré-incubadas com 1mM BSO e 1mM NAC por 24 h antes da irradiação. (D) efeito de tampões deuterados na morte celular induzida por fotossensibilização na presença de RB.

Figura 4.13: (A) quantificação de DADBO₂ em células pré-tratadas com 1mM de BSO e 1mM de NAC e irradiadas na presença de 5μM de RB. (B) avaliação da concentração de peróxidos em células pré-tratadas com BSO e NAC (1mM) em diferentes tempos de irradiação. (C) efeito de tampões deuterados e licopeno na formação de peróxidos em células irradiadas com 5μM de RB. (D) quantificação de peróxidos em frações aquosas e orgânicas gerados pela fotossensibilização de RB (5μM) em células pré-tratadas com 1μM de BSO, 1mM de NAC ou 5μM de licopeno.

Figura 4.14: (A) cinética de remoção de peróxidos gerados pela irradiação de células V79 na presença de 5μM de RB. Células foram pré-tratadas com 1mM de BSO e NAC antes da irradiação. (B) avaliação da remoção dos peróxidos nas frações

aquosas e orgânicas das células fotossensibilizadas, peróxidos foram medidos após 3h da irradiação.

Figura 4.15: Avaliação do efeito da exposição das células a FeSO_4 após fotossensibilização na presença de $5\mu\text{M}$ de RB. (A) avaliação da viabilidade celular e (B) formação de espécies reativas, monitorada pela oxidação do DCFH.

Figura 4.16: Avaliação do efeito protetor de carotenóides em células fotossensibilizadas na presença de $5\mu\text{M}$ de RB. (A) viabilidade de células V79 foi avaliada 24h após irradiação na presença de $5\mu\text{M}$ de luteína ou licopeno. Carotenóides foram adicionados 1h antes da irradiação ou adicionados após a irradiação. (B) quantificação do DADBO_2 formado em células pré-tratadas com $5\mu\text{M}$ de carotenóides.

Figura 4.17: (A) Avaliação da concentração de peróxidos em células pré-tratadas com luteína e licopeno ($5\mu\text{M}$) em diferentes tempos de irradiação. (B) cinética de remoção de peróxidos gerados pela irradiação de células V79 na presença de RB. Células foram pré-tratadas com $5\mu\text{M}$ de luteína ou licopeno por 1h antes da irradiação.

Figura 4.18: Formação de LAOOH em reações de fotossensibilização na presença de AM. (A) Análise por cromatografia de camada delgada de amostras fotossensibilizadas por diferentes tempos (0 – 5h). (B) Análise de absorção em 235nm de amostras fotossensibilizadas por diferentes tempos (0 – 5h).

Figura 4.19: Espectro de massa obtido no modo negativo das amostras de LA fotossensibilizadas na presença de oxigênio-16 e 18.

Figura 4.20: Fragmentação do LAOOH (A) e $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (B). C) Esquema de fragmentação dos principais isômeros de posição do LAOOH.

Figura 4.21: Avaliação da citotoxicidade do LAOOH em células V79. A) células V79 foram expostas a diferentes concentrações de LAOOH por tempos variando de 0 a 48h, resultados estão expressos em % em relação ao controle. B) efeito do pré-tratamento com 1mM de BSO e 100 μ M de MS na citotoxicidade induzida por 100 μ M de LAOOH (24h).

Figura 4.22: Produção de $^1\text{O}_2$ via LAOOH em extratos celulares. Efeito de diferentes concentrações de LAOOH na produção de $^1\text{O}_2$ em H_2O (A) e D_2O (B). Papel do grupo peróxido para a formação de $^1\text{O}_2$ via LAOOH; extratos foram incubados com 100 μ M de LA, LAOH e LAOOH em tampão deuterado na presença ou não de 100 μ M de FeSO_4 .

Figura 4.23: Papel de diferentes metais na formação de $^1\text{O}_2$. A) extratos celulares foram incubados com 100 μ M de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ em tampão deuterado na presença de diferentes concentrações de Fe^{2+} , Cu^+ e Ce^{4+} . B) efeito de diferentes estados de oxidação do ferro na formação de $^1\text{O}_2$ via LAOOH; extratos foram incubados com diferentes concentrações de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ na presença de 100 μ M de Fe^{2+} ou Fe^{3+} .

Figura 4.24: Papel de GSH e GPx na formação de $^1\text{O}_2$ via $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. Cinética de remoção de LAOOH em extratos celulares de células pré-tratadas com BSO (1mM) (A) ou MS (100 μ M) (C). Formação de DADBO_2 foi monitorada 0 ou 30min após adição do LAOOH aos extratos celulares pré-tratados com BSO (B) ou MS (D), seguido de adição de 100 μ M de FeSO_4 .

Figura 4.25: Células incubadas apenas com DADB sem adição de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ monitorando as transições correspondendo à adição de duas moléculas de oxigênio 18 (A); um oxigênio 18 e um oxigênio 16 (B) e dois oxigênios 16 (C) ao DADB. D) representa o cromatograma UV-vis das amostras.

Figura 4.26: Quantificação de DADBO₂ em células incubadas com DADB mais adição de LA¹⁸O¹⁸OH (A-D) ou LA¹⁸O¹⁸OH + Ce⁴⁺ por 30min, monitorando as transições correspondendo a adição de 2 átomos de oxigênio 18; um oxigênio 18 e um oxigênio 16 e dois oxigênios 16 ao DADB.

Figura 4.27: Viabilidade celular. Células foram pré-tratadas com 50 μM por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LA e LAOOH (0-200μM) por 6 (A), 24 (C) e 48h (E), ao final do período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT, como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e do grupo peróxido foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb e apo-Hb e após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas à 200μM LAOOH ou LAOH por 6 (B), 24 (D) e 48h (F). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média ± desvio padrão.

Figure 4.28: Peroxidação lipídica avaliada pelos níveis de MDA. Células foram pré-tratadas com 50μM de Hb por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LAOOH (0-50μM) (A). Em seguida foram quantificados os níveis de MDA como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e do grupo peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb ou apo-Hb. Após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas a 50μM LAOOH ou LAOH por 1h (B). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média ± desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ p<0.05). (*) Estatisticamente diferente de células não expostas à Hb; (+) Estatisticamente diferente de células não expostas ao LAOOH.

Figure 4.29: Avaliação do estado redox celular pela probe DCFH. Células foram pré-tratadas com 50 μ M de Hb por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LAOOH (0-50 μ M) (A). Em seguida o estado redox celular foi avaliado pela oxidação celular da probe DCFH, como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e do grupo peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb ou apo-Hb. Após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas a 50 μ M LAOOH ou LAOH por 1h (B). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$). (*) Estatisticamente diferente de células não expostas à Hb; (+) Estatisticamente diferente de células não expostas ao LAOOH.

Figura 4.30: Genotoxicidade da Hb, do LAOOH e sua combinação. Para a versão alcalina do comet, as células foram tratadas com várias concentrações de Hb (0-250 μ M) (A), LAOOH (0-100 μ M) (C). Para o tratamento em combinação as células foram pré-tratadas com 50 μ M de Hb e após remoção do meio de cultura LAOOH (0-50 μ M) foi adicionado (E). Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para a versão modificada do cometa (avaliação de lesões oxidativas) o mesmo protocolo foi utilizado e as concentrações seguintes (B) Hb (0-100 μ M), (D) LAOOH (0-50 μ M) e pre-tratamento (F). As análises foram realizadas utilizando um sistema semi-automatizado (KOMET 6.0). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Resultados estão apresentados como Olive tail moment. Barras representam média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$).

Figura 4.31: Efeito do grupo peróxido e heme nos danos em DNA induzidos pelo sistema Hb/LAOOH. O efeito do heme e do grupo peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com 50 μ M de Hb ou apo-Hb. Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio do cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para cada ponto experimental foram realizados três experimentos independentes e 50 células analisadas. Resultados estão apresentados como Olive tail moment. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$). (*) Estatisticamente diferente comparado à Hb; (+) estatisticamente diferente comparado a EtOH e LAOH. B a D apresentam micrografia representativas de células comet pré-tratadas com 50 μ M Hb por 60min e subsequentemente tratadas com EtOH, 50 μ M LAOH e 50 μ M LAOOH respectivamente.

Figura 4.32: Quantificação dos níveis de 8-oxodGuo. Para todos os experimentos as células foram pré-tratadas com 50 μ M Hb (ou não) por 1h, na sequência o meio de cultura foi substituído por meio novo contendo 50 μ M LAOOH. Representação de um cromatograma contendo 100 μ g de DNA. (A) Cromatograma UV ($\lambda = 265$ nm) das amostras apontando para os picos da timidina (Thd), desoxicitosina (dCyd), desoxiguanosina (dGuo) and desoxiadenosina (dAdo). (B) Representação de um cromatograma obtido no detector eletroquímico, apontando para o pico da 8-oxodGuo. (C) Quantificação dos níveis de 8-oxodGuo nos tratamentos descritos. Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$). (*) Estatisticamente diferente das células controle dR= 2-desoxirribose.

Figure 4.33: Cromatograma HPLC/ESI/MS-MS de uma amostra de 100µg DNA de células SW480. (A) 1,*N*²-εdGuo: *m/z* 292 / 176; (B) [¹⁵N₅]-1,*N*²-εdGuo: *m/z* 297/181, (C) 1,*N*²-propanodGuo: *m/z* 338/222; (D) [¹⁵N₅]-1,*N*²-propanodGuo: *m/z* 343 /227. (E) DNA hidrolisado enzimaticamente (λ=260nm). (F) Esquema apresentando a válvula utilizada para injeção das amostras no massa. dR= 2-desoxirribose.

Figura 4.34: Formação de adutos exocíclicos. Células foram pré-tratadas com 50µM Apo-Hb ou Hb por 1h e em seguida após troca do meio de cultura foram adicionados 50µM LAOOH ou LAOH por 1h. A quantificação dos adutos 1,*N*²-εdGuo (A) e 1,*N*²-propanodGuo (B), foi realizada como descrito na seção de materiais e métodos. Para condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Baras representam média ± desvio padrão. Significância estatística foi avaliada utilizando two-way ANOVA (*p<0.05). (+) Estatisticamente diferente da Hb; (*) estatisticamente diferente do LAOH.

Figure 4.35: Concentração de Ferro e danos em DNA. Para todos os experimentos as células foram pré-tratadas com 50µM de Hb por diferentes períodos de incubação (0-360h), na sequência as células foram lavadas e foi adicionado 50µM de LAOOH. (A) Concentração de Ferro nos lisados de células incubadas com 50µM de Hb por diferentes períodos. (B) Avaliação nos níveis de oxidação do DNA através da versão modificada do ensaio cometa (digestão com Fpg e Endo III). Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio do cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para cada ponto experimental foram realizados três experimentos independentes e 50 células analisadas. Resultados estão apresentados como Olive tail moment. Correlação dos níveis de sítios sensíveis a Fpg e Endo III com a concentração de ferro (C e D, respectivamente). E a H

representam micrografias representativas das condições pré-incubadas com 50 μ M de Hb por 0, 15, 60 e 240min e subsequente adição de 50 μ M de LAOOH.

Figura 5.1: Esquema indicando os possíveis processos pelos quais a glutathione poderia estar protegendo as células durante o processo de foto-oxidação.

Figura 5.2: Esquema indicando os possíveis processos pelos quais os carotenóides poderiam estar protegendo as células durante o processo de fotoxidação.

Figura 5.3: Esquema de captação ilustrando as diferentes vias que originam as massas geradas pela captação de diferentes isótopos do O₂.

Figura 5.4: Esquema de danos causados pelo sistema LAOOH/Hb.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Constantes de desativação total (k_t) do $^1\text{O}_2$ com algumas biomoléculas (Modificado de Ronsein et al., 2006).

Tabela 2: Gradiente utilizado para purificação dos LOOHs formados na fotossensibilização.

Tabela 3: Método de detecção de GSH e GSSG

Tabela 4: Gradiente utilizado durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS

1) Introdução

1.1) Aspectos gerais

Os primeiros estudos implicando o papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) em processos toxicológicos datam do início da década de 50, onde Ross (1950) justifica os efeitos tóxicos da radiação ionizantes à produção de radicais livres. No entanto seu papel em outros processos toxicológicos e fisiológicos era dado como secundário ou mesmo inexistente. Esta visão viria a mudar, mas levaria quase 20 anos. Em 1969, McCord e Fridovich descreveram pela primeira vez uma enzima capaz de catalizar a dismutação de um radical. A existência de uma enzima cujo substrato é o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) levou a uma mudança de paradigmas, desta forma diversos estudos começaram a identificar essas espécies em diversos processos biológicos. Culminado com o conhecimento que temos atualmente, onde radicais e outras espécies reativas são moléculas ubíquas em diversos processos fisiológicos e patológicos. Atualmente muito se sabe a respeito da química destes oxidantes e como estes reagem com biomoléculas (Winterbourne, 2008; Murphy et al., 2011). Sendo notável o número de estudos que têm surgido implicando oxidantes nos mais diversos processos celulares. O desafio atual da área redox é o de apresentar dados “fenomenológicos” de uma forma que demonstre fortes bases mecanísticas

Hoje em dia o termo espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para englobar uma vasta gama de espécies radicalares e não radicalares, derivadas do oxigênio e do nitrogênio (ERN), a utilização destes termos é muito genérica, e pouco informativa.

1.1.1) Radicais livres e espécies reativas: terminologia

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de elétrons desemparelhados geralmente confere um considerável grau de reatividade aos radicais livres. O termo “espécies reativas” muitas vezes utilizado para identificar radicais livres, engloba uma série de espécies radicalares ou não radicalares derivadas tanto de oxigênio como do nitrogênio.

Dentre estas espécies podemos citar espécies radicalares derivadas do oxigênio como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical perhidroxila ($HOO^{\cdot}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), radical alcóxila ($RO^{\cdot}$), radical peróxila ($ROO^{\cdot}$), radical ânion carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) e também espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxigênio singlete (1O_2) hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$) e ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge., 2007).

Figura 1.1: Principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio. SOD - superóxido dismutase; MPO – mieloperoxidase; CAT – catalase; GPX – glutathiona peroxidase; LH – lipídios, $LO^{\cdot}$ - radical alcóxila, $LOO^{\cdot}$ - radical peróxila. $ONOOCO_2^{\cdot-}$ -radical peroximonocarbonato. Destacados estão as vias de possível geração de 1O_2 em sistemas biológico.

De maneira análoga as espécies radiculares derivadas do nitrogênio são representadas pelo óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$) e as não radiculares como o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estudo de tais espécies é complexo, não podendo ser analisado de maneira pontual dado a grande interpolação existente na química de formação de tais compostos. A Figura 1 ilustra a sobreposição das vias de geração destas espécies de modo a ilustrar a química da geração das espécies reativas (ER).

1.1.2) Fontes de EROs e ERNs

Espécies reativas podem ser produzidas a partir de fontes endógenas e exógenas. Potenciais fontes endógenas incluem as mitocôndrias, a via metabólica do citocromo P450, peroxissomos, e ativação de células inflamatórias (Valko *et al.*, 2004, 2006).

Uma das principais fontes de espécies reativas é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde durante a transferência de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória, formas parcialmente reduzida de O_2 podem ser geradas (Fig.1.2). Acredita-se que cerca de 1-5% dos elétrons direcionados à cadeia de transporte sejam “perdidos” diretamente para o oxigênio (Halliwell *et al.*, 2007).

Figura 1.2: Redução sequencial do oxigênio, processo que ocorre na mitocôndria. O potencial redox de cada intermediário está demonstrado na Figura. (O_2 oxigênio molecular $\text{O}_2^{\bullet -}$ superóxido, H_2O_2 peróxido de hidrogênio, $\text{HO}^\bullet$ radical hidroxila, OH^- hidróxido) (Imlay, J.A.; 2008).

Além das mitocôndrias, existem outras fontes celulares de radical superóxido, por exemplo, xantina oxidase (XO), uma enzima amplamente distribuída entre diferentes espécies (de bactérias a mamíferos) e presente em vários tecidos de mamíferos (Li *et al.*, 2002). A XO é um membro de um grupo de enzimas conhecidas como hidroxilases molibdênio,ferro-enxofre flavina e catalisam a hidroxilação de purinas. Em especial, a XO cataliza a reação da hipoxantina a xantina e xantina em ácido úrico. Em ambas as etapas, o oxigênio molecular é reduzido, formando o ânion superóxido na primeira etapa e peróxido de hidrogênio na segunda (Valko *et al.*, 2004).

Outra importante fonte endógena de EROs, são os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Os macrófagos ativados apresentam um aumento no consumo de oxigênio que dá origem a uma variedade de EROs e ERNs, incluindo o ânion $O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ e H_2O_2 (Conner *et al.*, 1996). A flavoenzima, citocromo P450 também tem sido proposta como uma fonte de EROs. A indução desta enzima leva a formação de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 possivelmente devido ao escape de espécies parcialmente reduzidas do ciclo catalítico da enzima.

Além disso, microssomos e peroxissomos são fontes de EROs. Microssomas são responsáveis por 80% da concentração de H_2O_2 produzidos *in vivo* em locais de hiperóxia (Gupta *et al.*, 1997). Os peroxissomas são conhecidos por produzir H_2O_2 , mas não $O_2^{\cdot-}$, sob condições fisiológicas. Embora o fígado seja o principal órgão onde a contribuição dos peroxissomos para a produção de H_2O_2 é significativa, outros órgãos que contêm os peroxissomos também estão expostos a esses mecanismos de geração de H_2O_2 . A produção de H_2O_2 pela degradação de ácidos graxos nos peroxissomos é reconhecida como uma fonte potencialmente importante de H_2O_2 como resultado de jejum prolongado (Crescimanno *et al.*, 1989).

Espécies reativas de nitrogênio também são formadas por diferentes processos endógenos e exógenos a partir da reação de $\text{NO}^\bullet$ (Augusto *et al.*, 2002). Esta espécie é formada pela ação da enzima NO sintase (constitutiva ou induzível) através da reação da L-arginina e O_2 . O $\text{NO}^\bullet$ é uma molécula pouco reativa que se difunde com facilidade pelas células, e por isso, apresenta função importante na sinalização celular (Lancaster, 1997). Além disso, este radical está envolvido no aumento de tônus muscular, adesão celular, função renal, atividade antioxidante, danos ao DNA, lipoperoxidação, entre outras (Augusto, 2006).

O $\text{NO}^\bullet$ pode ainda reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ e dar origem ao ONOO^- , que é capaz de provocar lesões em proteínas, sobretudo em resíduos de tirosina (Cassina *et al.*, 2000), além de, gerar ânion radical carbonato, nitrito e nitrato (Ferrer-Sueta *et al.*, 2009).

1.1.3) Reatividade, tempo de vida e difusão

Diversos estudos já demonstraram a capacidades das EROs e ERNs de reagir com uma ampla gama de biomoléculas. No entanto, como descrito por Winterbourn (2008), nem todas estas reações são relevantes no contexto biológico, uma vez que, estudos utilizando apenas um substrato ignoram a competição entre diversos possíveis alvos. Este tipo de análise apresenta outro ponto importante no estudo das ER. A oxidação de alvos biológicos depende do quão rápido o oxidante em questão reage com o seu alvo (constante de reação, k) e também da concentração presente de substrato e de oxidantes.

O tempo de vida das espécies reativas em um ambiente celular é outro fator crítico no estudo de processos redox. O tempo de vida e a capacidade de difusão

destas espécies são diretamente relacionados com a velocidade com que estas reagem com as moléculas presentes no ambiente onde são geradas (Fig. 1.3).

Figura 1.3: Relação entre tempo de vida, reatividade e difusão de diferentes espécies reativas (Redmond e Kochevar, 2006) .

O tempo de vida destas espécies reativas pode ser representado por (τ), sendo recíproco à soma dos termos da equação abaixo (Eq. 1.1):

$$\tau = (k_d + k_1[\text{M}_1] + k_2[\text{M}_2] + \dots + k_n[\text{M}_n])^{-1} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Onde $k_1, k_2, \dots, k_n$ são as constantes de reação de n com as diferentes moléculas celulares ($\text{M}_1, \text{M}_2, \dots, \text{M}_n$). Um ponto importante a respeito do tempo de vida das espécies reativas, é que o valor de τ não diz respeito ao ponto no qual a espécie não esta mais presente, e sim o ponto onde a concentração da espécie cai para ~37% ($1/e$). Desta maneira, após 3τ apenas ~5% da especie em estudo ainda continua se difundindo (Redmond e Kochevar, 2006). As constantes de reações de diversas espécies reativas com diferentes substratos já foram descritos e podem ser utilizadas para estimar o tempo de vida em espaços subcelulares. Espécies altamente reativas como o $\text{OH}^\bullet$ apresentam tempo de vida muito baixo uma vez que esta espécies é capaz de reagir com a maioria das moléculas na ordem de $10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

($\tau < 10\text{ns}$) (Roots *et al.*, 1975). Diferente do H_2O_2 que apresenta baixa reatividade e tempo de vida relativamente alto podendo difundir para fora da célula (Halliwell *et al.*, 2007). No caso do $^1\text{O}_2$ o tempo de vida máximo desta espécie é limitado pelo seu decaimento, pois diferente das demais espécies reativas, o $^1\text{O}_2$ é uma espécie eletronicamente excitada, e esta existe no estado excitado apenas por um período máximo antes de decair ao estado fundamental transferindo sua energia para o solvente. Logo, na ausência de moléculas capazes de reagir com ele seu tempo de vida máximo em H_2O é de $4\mu\text{s}$ (Rodgers *et al.*, 1982)..

Para o caso das espécies altamente reativas como o $^1\text{O}_2$ e $^{\bullet}\text{OH}$ acredita-se que a sua reatividade fique confinada a regiões próximas ao seu local de geração, implicando que determinada resposta celular seria mediada pelos produtos formados pelas reações primárias envolvendo a molécula reativa e as moléculas vizinhas.

1.1.4) Defesas antioxidantes

Espécies reativas são formadas constantemente em sistemas biológicos, para isso, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes de forma a proteger--se dos possíveis danos causados por essas espécies. Por definição, pode ser denominado antioxidante qualquer molécula que inibe ou minimiza um processo de oxidação. Do ponto de vista biológico, um antioxidante protege biomoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos deletérios de substâncias que promovem a oxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007)

As defesas antioxidantes de um organismo compreendem:

→Agentes que removem cataliticamente essas espécies reativas, exemplos são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx).

→ Moléculas de baixo peso molecular, que capturam espécies reativas, exemplo destes compostos incluem ácido úrico, glutatona, vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos.

1.1.4.1) Defesas antioxidantes enzimáticas

1.1.4.1.1) Cu-Zn Superóxido Dismutase (CuZn-SOD)

Essa enzima encontra-se distribuída quase que ubiquamente no citosol de todas as células eucarióticas. A CuZn-SOD é uma proteína constituída de duas subunidades, com massa molecular de aproximadamente 32kDa. Essa proteína cataliza a seguinte reação (Eq. 1.2):

A velocidade de dismutação não enzimática é altamente dependente do pH da solução, sendo em pH fisiológico de $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A reação enzimática, ao contrário, não é afetada em pH de 5 a 9. Nesse sistema o cobre da enzima atua na dismutação através de um ciclo de oxidação (Eq. 1.3) e redução (Eq. 1.4).

Nesse ciclo, o Zn não apresenta funções catalíticas sendo importante apenas na manutenção estrutural da enzima.

1.1.4.1.2) Catalase

A catalase é uma das enzimas responsáveis pela remoção de H_2O_2 das células e se encontra localizada nos peroxissomos. Ela é composta por quatro subunidades, onde cada uma dessas apresenta um grupo heme. A reação catalisada pela enzima é a seguinte (Eq. 1.5):

O mecanismo catalítico dessa enzima é bastante similar ao da SOD, isto é, a mesma espécie é oxidada (Eq. 1.6) e em seguida reduzida (Eq. 1.7) (dismutação).

Essa reação tem uma constante de velocidade de $2 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

1.1.4.1.3) Peroxirredoxinas (Prx)

Peroxirredoxinas são uma família de peroxidases dependente de tioredoxina, essas enzimas são capazes de reduzir H_2O_2 e peróxidos orgânicos, estão geralmente presentes na forma de um homodímero, e a catálise da sua reação depende do aminoácido cisteína presente no sítio ativo. Estas enzimas podem ser ainda subdivididas em 3 classes, 2-cys típica, 2-cys atípica e 1-cys. Durante a catálise, a cisteína (“peroxidatic cysteine”) do sítio ativo é oxidada a um ácido sulfênico (-SOH), este por sua vez pode reagir com uma cisteína próxima (“resolving cysteine”) formando uma ponte dissulfeto. No caso das Prx 2-cys típicas, a ponte dissulfeto é intermolecular e intramolecular, no caso das atípicas. Prx-1 não apresentam formação de uma ponte dissulfeto, e ainda não há consenso sobre qual

o substrato responsável pela redução do-SOH (Hall *et al.*, 2009). Estudos recentes têm apontado para a grande importância destas enzimas na remoção de peróxidos (principalmente H_2O_2), mesmo sendo mais lentas cataliticamente quando comparadas às GPx, seu baixo K_m e sua alta concentração compensam por isso, fazendo com que estas sejam o principal alvo de baixas concentrações de H_2O_2 . No entanto estudos mostram que essa mesma afinidade é diminuída drasticamente para outros tipos de peróxidos, como os de lipídios e proteínas (Netto *et al.*, 2007; Parsonage *et al.*, 2008; Peskin *et al.*, 2010).

1.1.4.1.4) Tiorredoxinas (Trx)

Tioredoxinas são proteínas pequenas de aproximadamente 12kDa. Diversos tipos de Trx já foram descritas, entre elas estão a forma citosólica (Trx1) e a forma mitocondrial (Trx2). Essas proteínas quando na forma reduzida apresentam 2 grupos -SH que ao oxidar-se formam uma ponte dissulfeto (Eq. 1.8). Trx são capazes de interagir e iniciar reações redox com uma ampla gama de proteínas.

Trx oxidadas são reduzidas pelas selenoproteínas, Trx redutases (TrxR). Estas utilizam NADPH como equivalente redutor na reação de redução das Trx (Eq. 1.9 e 1.10). (Holmgren, 2000)

1.1.4.1.5) Glutathione Peroxidase (GPx)

Atualmente existe, descritas 8 isoformas da GPx. Em mamíferos são em sua maioria peroxidases dependentes de GSH, capazes de reduzir H_2O_2 e peróxidos orgânicos a H_2O e seus respectivos álcoois (Conrad, 2009). Das isoformas conhecidas, GPx 1-4 e GPx 6 são selenoproteínas, enquanto as isoformas GPx 5, 7 e 8 apresentam uma cisteína no sítio catalítico. O mecanismo proposto para catálise realizada pelas seleno-glutathione peroxidases é como se dá abaixo (Eq. 1.11 a 1.14):

Em seguida, a molécula de GSH pode ser reduzida através da enzima glutathione redutase, que utiliza NADPH como cofator para essa redução. Apesar de essas enzimas utilizarem GSH como substrato redutor para a catálise da sua reação, algumas isoformas não são limitadas à apenas esse substrato.

a) Glutathione peroxidase 1 (GPx1)

GPx1 foi a primeira selenoproteína descrita na história (Flohe *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973). Essa enzima é um homotetrâmero expresso ubiquamente no citosol de células eucarióticas; ela é capaz de reduzir H_2O_2 e uma ampla gama de peróxidos orgânicos, incluindo hidroperóxidos de colesterol e de ácidos graxos. A GPx1 é capaz de reduzir apenas hidroperóxidos de ácidos graxos após estes serem liberados dos fosfolipídios pela ação da fosfolipase A2. Animais *knockout*, para esta enzima, não apresentam nenhum fenótipo característico em condições normais (Ho

et al., 1997), no entanto apresentam uma maior sensibilidade quando tratados com naftoquinonas (Cheng *et al.*, 1998, 1999; Fu *et al.*, 1999).

b) Glutathione peroxidase 2 (GPx2)

GPx1 e 2 apresentam uma especificidade de substrato bastante similar, sendo ambas eficientes na remoção de H_2O_2 e peróxidos orgânicos, no entanto sendo ineficazes na remoção de peróxidos gerados em fosfolipídios. Com relação a sua distribuição, GPx2 é um homotetrâmero encontrado em fígado e epitélio do trato gastrointestinal, o que sugere uma importância na remoção de hidroperóxidos derivados da dieta. Animais *knockout* para esta enzima, não apresentam fenótipo característico (Esworthy *et al.*, 2000).

c) Glutathione peroxidase 3 (GPx3)

GPx3 é um homotetramero encontrado extracelularmente principalmente no plasma e no intestino, com especificidade para hidroperóxidos de fosfolipídios apresentando possivelmente efeito protetor nas membranas celulares externas (Yamamoto *et al.*, 1993). Com relação a sua expressão, esta enzima encontra-se expressa principalmente nos rins (Avissar *et al.*, 1994), no entanto sua real função fisiológica ainda é desconhecida. Knockouts para esta enzima não apresentaram fenótipo distinto (Olson *et al.*, 2009).

d) Glutathione peroxidase 4 (GPx4)

GPx4 foi uma enzima descrita por sua capacidade de proteger lipossomos e biomembranas de lipoperoxidação, sendo assim implicada na proteção de biomembranas contra o estresse oxidativo (Ursini *et al.*, 1982). No entanto esta é

uma enzima monomérica e não depende exclusivamente de GSH como substrato redutor, podendo em determinados momentos utilizar tióis proteicos passando a atuar como uma proteína tiol peroxidase (Conrad *et al.*, 2005).

1.1.4.2) Defesas antioxidantes não enzimáticas

1.1.4.2.1) Glutathione

A GSH, à parte de seu papel como fonte de potencial redutor para as reações catalisadas pela glutathione peroxidase, está envolvida em muitos outros processos metabólicos, que incluem desde a detoxificação de xenobióticos como a manutenção da comunicação intracelular (Wu *et al.*, 2004). Este tripeptídeo é o composto sulfidril não proteico mais abundante nas células, estando presente em concentrações de até 10 mM. Sua forma oxidada consiste de duas moléculas de GSH (GSSG) ligadas por uma ponte dissulfeto, representando cerca de 1% da GSH total em condições normais. O par GSH/GSSG devido às suas altas concentrações é tido como o principal tampão redox celular (Meister, 1994; Meister and Anderson, 1983). O estado redox celular é determinante no destino celular, por exemplo, em um estado proliferativo, as células apresentam um estado redox de aproximadamente 240mV, na diferenciação valores de 200mV e em apoptose, valores de 170mV.

1.1.4.2.2) Síntese da glutathione

A síntese da molécula de glutathione a partir de glutamato, cisteína e glicina ocorre por um processo sequencial envolvendo a ação de duas enzimas citosólicas.

Figura 1.4: Representação da síntese da molécula de glutathione, a primeira etapa desta via é realizada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase e a segunda pela glutathione sintetase, ambas as etapas são ATP dependentes.

Primeiro, a enzima γ -glutamilcisteína sintetase catalisa a formação do dipeptídeo γ -glutamilcisteína, este por sua vez é substrato da enzima glutathione sintetase, enzima responsável pela adição da molécula de glicina originando o tripeptídeo glutathione (Figura 1.4). Esta sequência de reações ocorre em basicamente todos os tipos celulares, sendo o fígado o principal sítio de síntese e exportação da GSH (Griffith, 1999).

A importância da GSH para a vida dos mamíferos foi demonstrada pela deleção do gene γ -GCS em camundongos. Animais deficientes em γ -GCS são incapazes de sintetizar GSH e são embrionicamente inviáveis (Shi *et al.*, 2000). A

atividade enzimática da γ -GCS pode ser eficientemente bloqueada pelo inibidor químico L-butionina sulfoximina (BSO). Esta molécula se liga irreversivelmente ao sítio ativo da γ -glutamilcisteína sintetase, assim diminuindo os níveis de glutatona dentro da célula. Isso é possível principalmente devido à rápida reciclagem deste tripeptídeo (~3horas).

O substrato limitante para essa reação é a cisteína. Cisteína reduzida pode ser transportada para o interior da célula pelo sistema transportador inespecífico de aminoácidos ASC (sistema utilizado para o transporte de Ala, Ser e Cys). O aminoácido cisteína pode também ser transportado na forma oxidada denominada de cistina (Cys)₂. A (Cys)₂ é impulsionada para dentro da célula pelo sistema trocador Glu/(Cys)₂, sistema x_c⁻ (Sato *et al.*, 1999). Uma vez incorporada, ela é rapidamente reduzida a Cys, forma em que é utilizada na síntese proteica e de GSH.

A glutatona como um antioxidante pode interagir diretamente com agentes oxidantes como $\cdot\text{OH}$, HOCl , $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ e $^1\text{O}_2$. Geralmente a reação da glutatona com radicais livres pode gerar radicais tiíla ($\text{GS}\cdot$) que por sua vez podem gerar superóxido pela seguinte reação (Eq. 1.15 e 1.16):

Esse radical superóxido pode, por sua vez, ser alvo da enzima SOD culminando com dismutação deste a H_2O_2 .

1.1.4.2.3) Carotenóides

Carotenóides são pigmentos coloridos amplamente distribuídos em vegetais, estas moléculas fazem parte de outra importante classe de antioxidantes. Os

carotenoides são moléculas acessórias dos sistemas antena. Este complexo é formado por carotenóides e clorofilas. O principal papel dos carotenóides deste sistema é o de proteger o pigmento fotossintético contra danos causados por excesso de luminosidade e estresse foto-oxidativo (Demmig Adams e Adams, 2002).

Referente à sua estrutura, os carotenóides apresentam uma longa cadeia central de carbonos com duplas ligações conjugadas, que podem por sua vez portar substituintes cíclicos ou acíclicos. Xantofilas, são carotenóides que apresentam oxigênio em seus grupos funcionais, sendo assim conhecidos por oxocarotenóis (Olson e Krinsky, 1995).

Com relação à nutrição humana, aproximadamente 10% dos carotenóides encontrados na natureza são utilizados para originar a vitamina A (Sies *et al.*, 1995). Nos humanos o principal carotenóide com esta função é o β -caroteno (Halliwell *et al.*, 2007). A disponibilidade dos carotenóides das matrizes dos alimentos, sua solubilização no intestino, que requer a presença de gorduras e ácidos conjugados da bile, e sua absorção nas mucosas intestinais são processos biológicos importantes. Uma vez nas células, os carotenóides são metabolizados pela clivagem oxidativa por rotas distintas formando retinal, ácido retinóico (vitamina A) e pequenas quantidades de produtos de clivagem, os β -apocarotenais (Sies *et al.*, 1995). Carotenóides são transportados por lipoproteínas no plasma, estando associados, principalmente, a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e às xantofilas; carotenóides que contêm átomos de oxigênio estão distribuídas entre as LDL e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Olson *et al.*, 1995). A cadeia contendo os elétrons delocalizados ao longo de sua estrutura carbônica é essencial para as características antioxidantes dos carotenóides (Young e Lowe, 2001). Estudos recentes têm sugerido que o envelhecimento celular disparado por radiação UV-A

está associado às vias de sinalização celular associadas à formação de $^1\text{O}_2$. Nesses sistemas, β -caroteno apresentou um efeito protetor que está relacionado em parte à sua alta eficiência de desativação do $^1\text{O}_2$ (Cantrell *et al.*, 2003).

1.2) Oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$)

O $^1\text{O}_2$ tem atraído muito o interesse dos pesquisadores nos últimos anos (Ogilby, 2010). O estudo sobre o papel do $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos é de extrema relevância. Essa espécie apresenta alta reatividade frente a muitas funções orgânicas ricas em elétrons. Moléculas fundamentais, como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA são importantes alvos biológicos deste oxidante (Sies, 1992 e Di Mascio *et al.*, 1990).

O oxigênio no estado excitado singlete pode apresentar duas formas: o $^1\Delta_g$ e o $^1\Sigma_g^+$, tendo o primeiro estado energia 22kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (2-4 μ s em H_2O) e o segundo tendo energia de 37,5kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Consequentemente, em razão da maior estabilidade do estado $^1\Delta_g$, essa forma é a de maior relevância para sistemas biológicos (Frimer, 1985). Desse modo é a forma $^1\Delta_g$, que será denotada por $^1\text{O}_2$.

Em função de sua configuração eletrônica (Fig.1.5), o $^1\text{O}_2$ apresenta características peculiares quando comparado ao oxigênio no estado fundamental. No estado fundamental, o oxigênio apresenta dois elétrons desemparelhados em orbitais separados (π^*) de spins paralelos na sua camada eletrônica mais externa, sendo considerando por definição um birradical. Apesar de ser um birradical, o oxigênio no estado fundamental é pouco reativo, isso se deve ao fato de os dois

elétrons desemparelhados apresentarem o mesmo spin e sua redução direta por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Conferindo desta forma uma baixa reatividade ao oxigênio frente às diversas funções orgânicas.

Figura 1.5: Configuração eletrônica do O₂. Configuração dos elétrons na camada $2\pi^*$ do oxigênio molecular ($3\Sigma_g^-$) e do estado excitado singlete ($1\Delta_g$ e $1\Sigma_g^+$) dos elétrons na última camada.

No entanto, diferente do oxigênio no estado fundamental, o $^1\text{O}_2$ apresenta uma inversão de spin em sua camada eletrônica externa. Essa mudança faz com que esta espécie agora possa sofrer uma redução direta por dois elétrons, graças à inversão do spin.

1.2.1) Tipos de reações do oxigênio singlete.

As reações do $^1\text{O}_2$ com compostos insaturados podem ser organizadas em três tipos: reações do tipo *ene*, que tem como produto hidroperóxidos; reações de cicloadição [2+2], resultando em 1,2-dioxetanos; e reações de cicloadição [4+2], resultando na formação de endoperóxidos.

a) Reações do tipo “ene”

As reações do tipo “ene” (Fig. 1.6) foram originalmente descobertas por Schenk em 1943, sendo Foote (1964b) o pioneiro na identificação desse tipo de reação nas reações de oxidação de olefinas e compostos dienólicos com o $^1\text{O}_2$

Figura 1.6: Reação tipo ene. Representação de uma reação do tipo ene, com formação de um hidroperóxido e consequente deslocamento da dupla.

Esse tipo de reação envolvendo o $^1\text{O}_2$ e oleofina com hidrogênio alílico geram hidroperóxidos como produtos finais seguido de deslocamento da dupla ligação.

b) Cicloadição [2+2]

Reações de cicloadição [2+2] (Fig. 1.7) competem com as reações do tipo “ene” e ocorrem em substratos ricos em elétrons ou com olefinas, esse tipo de reação tem como característica a geração de dioxietanos (Schaap e Zaklika, 1979). A geração de dioxietanos é acompanhada pela sua rápida decomposição gerando carbonilas, sendo uma delas em estado excitado (triplete) que pode ser acompanhada pela emissão de luz na região do visível.

Figura 1.7: Cicloadição [2+2]. Representação de uma reação do tipo [2+2], com formação de um dioxetano.

c) Cicloadição [4+2]

Cicloadições [4+2] (Fig. 1.8) são observadas em substratos que apresentam dienos conjugados, gerando como produto final endoperóxidos. A estabilidade desses compostos varia muito e sua formação é bastante favorecida através de substituintes doadores de elétrons.

Figura 1.8: Cicloadição [4+2]. Representação de uma reação do tipo [4+2], com formação de um endoperóxido.

Um exemplo clássico dessa reação é a reação do $^1\text{O}_2$ com compostos aromáticos, como por exemplo, os derivados de antraceno e naftaleno.

1.2.2) Oxigênio singlete em sistemas biológicos**a) Reações de fotossensibilização**

Reações de fotossensibilização são reações envolvendo um fotossensibilizador, luz e oxigênio. Durante o processo de absorção de luz o fotossensibilizador absorve um fóton e passa para um estado excitado. O processo fotoquímico que ocorre após a excitação do fotossensibilizador pode ser dividido em dois tipos: fotossensibilização do tipo I, no qual ocorre transferência de e^- ou H do substrato (RH) para o ^3S , estas reações geralmente envolvem a presença de

espécies radicalares, por outro lado, reações do tipo II, não apresentam intermediários radicalares havendo apenas a transferência de energia do 3S para o 3O_2 gerando 1O_2 (Foote, 1968) (Fig.1.9).

Figura 1.9: Esquema de fotossensibilização. Representação das reações de fotossensibilização do tipo I e II após a excitação de um fotossensibilizador.

Esse tipo de reação aparentemente está relacionado ao processo tóxico envolvendo a exposição à luz UVA. Entre as moléculas endógenas capazes de absorver luz podemos destacar sensibilizadores como tetrapirróis, flavinas e piridinas reduzidas. Vale ressaltar que exposição a fotossensibilizadores endógenos levando ao desencadeamento de processos fototóxicos já foram demonstrados para diversos tipos de cosméticos, aditivos alimentares e fármacos (Chignell *et al.*, 1985).

Processos utilizando fotossensibilizadores têm sido também aplicados na medicina, em terapias conhecidas como terapia fotodinâmica (PDT) (Dougherty *et al.*, 1998).

b) Burst oxidativo

No processo de fagocitose os neutrófilos são capazes de destruir organismos fagocitados. Após a formação do fagossomo, a enzima NADPHoxidase é recrutada para a membrana dessa organela, desencadeando um rápido consumo de O_2 e NADPH, gerando $O_2^{\cdot-}$ que rapidamente é dismutado em H_2O_2 . Esse por sua vez é substrato da enzima mieloperoxidase, que o utiliza para gerar HOCl, um forte oxidante (Fig.1.10).

Figura 1.10: Burst oxidativo de neutrófilos. Representação dos oxidantes gerados com neutrófilos estimulados. NOS, óxido nítrico sintase e MPO, mieloperoxidase.

Durante o *burst* oxidativo de neutrófilos e eosinófilos foi demonstrada a produção de $^1\text{O}_2$ através de captação química, utilizando o 9,10-difenilantraceno (DPA) (Steinbeck *et al.*, 1992, 1993). O mecanismo proposto para geração de $^1\text{O}_2$ nesse sistema envolve a reação da forma desprotonada do HOCl com o H_2O_2 (Eq. 1.17).

No entanto, devido à acidez do fagossomo, o HOCl encontra-se protonado ($\text{pK}_a \sim 7$), desta forma, desfavorecendo este tipo de reação dentro do fagossomo (Hampton *et al.*, 1998).

Alguns autores acreditam na possível dismutação não enzimática do $\text{O}_2^{\bullet -}$ levando à formação de H_2O_2 e $^1\text{O}_2$. Essas especulações não são corroboradas por dados cinéticos, uma vez que a dismutação enzimática do $\text{O}_2^{\bullet -}$ pela SOD é cerca de quatro ordens de magnitude superior à reação não catalisada.

Figura 1.11: Decomposição do peroxinitrato. Representação da geração de oxigênio singlete pela decomposição de peroxinitrato (mod de Miyamoto *et al.*, 2009).

Outro possível mecanismo para a geração de $^1\text{O}_2$ no fagossomo é baseado na decomposição do ONOO^- ($\text{pKa} \sim 6$). ONOO^- pode ser gerado pela reação rápida entre $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$. O pH levemente ácido do fagossomo favorece a forma protonada (ONOOH). ONOOH é instável e rearranja gerando os radicais: $\text{NO}_2^\bullet$ e $^\bullet\text{OH}$. No fagossomo, $\text{NO}_2^\bullet$ pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerado em excesso pela NADPH oxidase formando O_2NOO^- em seguida decompondo para NO_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou alternativamente para $\text{NO}_2^\bullet$ e $^1\text{O}_2$ (Fig.1.11).

c) Hidroperóxidos biológicos como fonte de $^1\text{O}_2$

Trabalhos do nosso grupo (Miyamoto *et al.*, 2003a, 2003b, 2005 e 2006) demonstraram claramente a geração de $^1\text{O}_2$ através da decomposição de hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH). Esses estudos apontaram para a importância de hidroperóxidos como possíveis fontes de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos.

Figura 1.12: Mecanismo de Russel. Esquema apresentando o mecanismo proposto por Russell para a formação de $^1\text{O}_2$ através da reação de dois radicais peroxila. No esquema também está apresentada a possibilidade de formação de carbonila triplete ($\text{R}=\text{O}^*$).

O mecanismo geral de formação de $^1\text{O}_2$ por hidroperóxidos foi proposto por Russell (1957), trabalhando com hidroperóxidos orgânicos. Nesse mecanismo, radicais peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), derivados da decomposição dos hidroperóxidos contendo

um H- α , reagem entre si gerando um intermediário tetraoxo linear (ROOOOR) que se decompõe via um mecanismo cíclico, gerando uma cetona (R=O), um álcool (R-OH) e oxigênio. De acordo com a regra de conservação de spin de Wigner, foi proposto que esta reação é capaz de gerar oxigênio no estado singlete ou carbonila triplete (Howard e Ingold 1968) (Fig.1.12).

Estudos posteriores sugeriram que a espécie predominantemente formada nessa reação era o $^1\text{O}_2$ e que o rendimento de carbonila triplete era 1000 a 10000 vezes inferior (Mendenhall *et al.* 1991). Além de lipídios, é possível que moléculas como hidroperóxidos de aminoácidos como Valina, Lisina e Leucina possam ser precursores da geração de $^1\text{O}_2$ uma vez que essas moléculas são passíveis de sofrer mecanismo de Russel (Fig.1.13).

Figura 1.13: Formação de hidroperóxidos proteicos. Geração de hidroperóxidos na cadeia peptídica mediada por $^\bullet\text{OH}$; abaixo estão indicados aminoácidos que apresentam grupo hidroperóxido e carbono α .

Além de hidroperóxidos de aminoácidos, proteínas e lipídios estudos recentes demonstraram que hidroperóxidos de timina gerados a partir de um ataque pelo forte oxidante $\cdot\text{OH}$ (Fig.1.14) podem formar $^1\text{O}_2$ (Prado *et al.*, 2009).

Figura 1.14: Hidroperóxidos de timina. Geração de hidroperóxidos de timina mediada por $\cdot\text{OH}$, indicando os três diferentes hidroperóxidos gerados pela ação do radical $\cdot\text{OH}$.

1.2.3) Respostas celulares ao $^1\text{O}_2$

Muitos processos de sinalização em sistemas biológicos são iniciados pela interação de ligantes com seus respectivos receptores. Estas interações resultam em padrões específicos de ativação de determinada via de sinalização culminando com uma resposta celular. O fato do $^1\text{O}_2$ ser capaz de não apenas matar as células,

mas também de provocar uma resposta ao estresse celular implica que existem mecanismos celulares que são capazes de transduzir a ação do $^1\text{O}_2$ (Klotz *et al.*, 2003). Sequências de sinalização iniciadas por alterações oxidativas levando à ativação de fatores de transcrição já foram identificados. Da mesma forma, cascatas de sinalizações iniciadas por reações oxidativas culminado com processos apoptóticos também foram relatados (Kochevar, 2004).

Figura 1.15: Transdução de sinal iniciada por $^1\text{O}_2$. Representação dos possíveis mecanismos de iniciação de uma resposta celular, demonstrando (1) oxidação direta de uma proteína sinalizadora. (2) Oxidação de compostos celulares que podem originar compostos secundários mais estáveis capazes de interagir com uma proteína sinalizadora e (3) ou alteração do estado redox celular (diminuição na razão entre pares redox como GSH/GSSG) levando a consequente oxidação de uma proteína sinalizadora (modificado de Kochevar, 2004).

O mecanismo para transdução atualmente acredita em três possíveis hipóteses, são estas: (1) oxidação direta de um componente de sinalização por $^1\text{O}_2$, (2) a formação de produtos da oxidação perto dos locais de geração do $^1\text{O}_2$ que se difundem reagindo com componentes do processo de sinalização, e (3) alteração do balanço redox da célula a um estado mais oxidado, tal que uma maior proporção de um componente da via de sinalização é oxidado (Fig. 1.15).

Até o momento pouco se sabe sobre os mecanismos de sinalização desencadeados pela geração de $^1\text{O}_2$. Entretanto um dos sistemas mais bem estudados aponta o $^1\text{O}_2$ como um dos eventos primários nos processos de envelhecimento e remodelamento da epiderme causado pela radiação UV-A (Krutmann, 2000). Foi demonstrado que células expostas à radiação UV-A apresentaram níveis elevados de expressão da proteína de adesão ICAM-1, e este mecanismo foi dependente dos níveis intracelulares de GSH (Christoph *et al.*, 1993). Posteriormente foi demonstrado que essa expressão era aumentada na presença de D_2O e inibida na presença de carotenóides e azida, implicando desta maneira o $^1\text{O}_2$ neste processo (Krutmann e Grewe, 1995). O mesmo grupo foi capaz de mostrar que esta ativação era dependente do fator de transcrição AP-2 e que a utilização da fonte limpa de $^1\text{O}_2$, o endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato de sódio (NDPO_2), apresentou a mesma eficiência na ativação quando comparada a luz UV-A. Comprovando esta hipótese, a deleção do sítio de ligação de AP-2 no promotor de ICAM-1 inibiu completamente a ativação por UV-A e NDPO_2 (Grether-Beck *et al.*, 1996). Interessante notar que a produção de $^1\text{O}_2$ pelo NDPO_2 é extracelular, implicando eventos na membrana celular como mediadores do efeito do $^1\text{O}_2$. Tal fato foi mais tarde comprovado, demonstrando que luz UV-A e $^1\text{O}_2$ gerado na membrana celular eram capazes de oxidar a esfingomielina liberando ceramida, esta por sua

vez demonstrou ser uma forte ativadora da ligação de AP-2 ao promotor de ICAM-1 (Grether-Beck *et al.*, 2000). No entanto os mecanismos para essa oxidação não foram investigados, sendo necessários mais estudos para compreender a liberação de ceramida causada por $^1\text{O}_2$.

1.2.4) Detecção de $^1\text{O}_2$

Um dos desafios no estudo das espécies reativas é a sua detecção confiável. Pela sua própria natureza as espécies reativas geralmente apresentam um tempo de vida baixo, consequentemente dificultando a sua detecção. De maneira que estudos tentando implicar uma espécie reativa lançam mão de diversas técnicas possibilitando assim obter uma assinatura robusta da sua geração.

1.2.4.1) Utilização de supressores e potenciadores

Muitos estudos visando à implicação do $^1\text{O}_2$ em determinado processo biológico utilizaram abordagens baseadas em supressores e potenciadores do tempo de vida do $^1\text{O}_2$. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é aumentado cerca de 10 vezes em água deuterada (D_2O) em relação a H_2O (Rodgers e Snowden, 1982), esse tipo de estudo espera que um determinado parâmetro dependente de $^1\text{O}_2$ seja aumentado quando houver a troca para um solvente deuterado. Vale ressaltar que valores obtidos em estudos biológicos não atingem um aumento esperado de 10x em determinado parâmetro, isso se deve à complexidade do ambiente intracelular que é capaz de suprimir com maior eficiência o $^1\text{O}_2$ quando comparado a um sistema modelo *in vitro* (Tyrrell, 2000; Ronsein *et al.*, 2011).

A utilização de supressores fundamenta-se no princípio inverso. Aqui a utilização de supressores como carotenóides (Di Mascio *et al.*, 1989, 1990) e azida (Li *et al.*, 2001) seria capaz de reduzir determinado efeito dependente de $^1\text{O}_2$. A maior desvantagem das metodologias utilizando supressores e potenciadores esta em sua baixa especificidade. Dessa forma, o emprego destas metodologias deve ser utilizado preferencialmente em associação com parâmetros mais específicos (Ronsein *et al.*, 2011).

1.2.4.2) Detecção de $^1\text{O}_2$ através de luminescência

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie excitada, sendo capaz de emitir luz quando retorna ao seu estado fundamental. O decaimento do $^1\text{O}_2$ ao estado fundamental gera uma emissão de luz em 1268 nm. Esse tipo de emissão é denominado de monomol (Eq.1.18) (Khan e Kasha, 1963). O $^1\text{O}_2$ pode decair pela colisão entre duas moléculas de $^1\text{O}_2$, resultando no decaimento das duas moléculas com emissão de luz em 634 e 703 nm. Já esse processo é conhecido como emissão dimol (Eq.1.19) (Cadenas e Sies, 1984). Dessa maneira, a detecção da emissão de luz nos comprimentos de ondas citados tem sido usados para a detecção de processos que envolvam a produção de $^1\text{O}_2$.

1.2.4.3) Reação de $^1\text{O}_2$ com biomoléculas: Biomarcadores

O $^1\text{O}_2$ é capaz de modificar diversas estruturas biológicas como DNA, proteínas e lipídios. Diversos desses produtos já foram isolados e caracterizados, podendo ser utilizados como biomarcadores de exposição ao $^1\text{O}_2$. As velocidades de reação do $^1\text{O}_2$ com as diferentes moléculas variam bastante, a Tabela 1 apresenta as constantes de desativação total (k_t) do $^1\text{O}_2$, é importante resaltar que k_t é resultado da soma da k_q e k_r ($k_t = k_q + k_r$). Sendo k_q a constante de supressão física e k_r a constante de supressão química (Farmilo e Wikinson, 1973). Para todas as moléculas citadas na Tabela 1 a desativação física é negligenciável, sendo então $k_t = k_r$. Como descrito anteriormente a eficiência de um biomarcador esta limitada também a sua presença em regiões próximas aos sítios de geração do $^1\text{O}_2$ e também devem ser capazes de reagir rapidamente.

Tabela 1. Constantes de desativação total (k_t) do $^1\text{O}_2$ com algumas biomoléculas (Modificado de Ronsein et al., 2006)

Composto	k_t ($10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Ref
Triptofano	32	Michaeli et al., (1994)
Histidina	46	Michaeli et al., (1994)
Tirosina	2-5	Michaeli et al., (1994)
Cisteína	50	Michaeli et al., (1994)
Metionina	13	Michaeli et al., (1994)
Ácido linoléico	0,073	Vever-Bizet et al., (1989)
Colesterol	0,057	Vever-Bizet et al., (1989)
Guanina	3	Prat et al., (1997)
Citosina	0,058	Prat et al., (1997)

1.2.4.3.1) Reações com DNA

Dentre as bases de DNA, a guanina é a única base não modificada capaz de reagir com o $^1\text{O}_2$ em pH fisiológico (Steenken e Jovanovic, 1997).

Figura 1.16: Oxidação da deoxiguanosina. Esquema apresentando a oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$ e por oxidantes ($1e^-$) resultando na formação do mesmo produto (8-oxodGuo).

Estudos utilizando nucleotídeos isolados mostraram que a reação do $^1\text{O}_2$ com a desoxiguanosina (dGuo) gera dois diastereoisômeros da spiroiminodihidantoína como produtos primários e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) como produto secundário (Buchko *et al.*, 1992). No entanto, Ravanat e colaboradores (2000) demonstraram que o único produto detectado em DNA dupla fita era a 8-oxodGuo. O mecanismo de formação dessas lesões está demonstrado na Figura

1.16. Mesmo a 8-oxodGuo sendo o único produto formado na reação com o $^1\text{O}_2$, seu uso como um biomarcador para $^1\text{O}_2$ apresenta dificuldades uma vez que uma ampla gama de espécies reativas é capaz de induzir à formação dessa lesão no DNA (Cadet *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que o produto gerado pela reação do $^1\text{O}_2$ com a dGuo, a 8-dGuo, reage muito mais rapidamente com o $^1\text{O}_2$ do que a dGuo (aproximadamente duas ordens de grandeza). Foi demonstrado que o ataque do $^1\text{O}_2$ a 8-oxodGuo em DNA apresentou como produto primário o ácido oxalúrico (dOxa) (Fig. 1.17). O ataque do $^1\text{O}_2$ a 8-oxodGuo dá origem a um hidroperóxido no carbono 5 que decompõe na sequência originando dOxa. Esta lesão estaria possivelmente relacionada à indução de quebra de fita simples mediada por $^1\text{O}_2$ (Ravanat *et al.*, 2004).

Figura 1.17: Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina. Esquema apresentando a oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina por $^1\text{O}_2$ em DNA dupla fita dando origem ao ácido oxalúrico.

1.2.4.3.2) Reações com Colesterol

Ácidos graxos insaturados e colesterol (Chl) presentes em membranas celulares são alvos passíveis de reação com o $^1\text{O}_2$.

Figura 1.18: Foto-oxidação do colesterol. Exemplo de produtos de oxidação gerados na fotossensibilização do colesterol, e alguns de seus produtos secundários.

O colesterol tem recebido grande atenção nos últimos anos devido a sua possível utilização como biomarcador de exposição a $^1\text{O}_2$. A reação do $^1\text{O}_2$ com uma molécula de colesterol pode levar à formação de 3β-hidroxi-5α-cholestano-6-ene-5-hidroperóxido ($5\alpha\text{-OOH}$), 3β-hidroxicolestano-4-ene-6α-hidroperóxido ($6\alpha\text{-OOH}$) e 3β-hidroxicolestano-4-ene-6β-hidroperóxido ($6\beta\text{-OOH}$) (Fig.1.18). Entretanto, a utilização do $5\alpha\text{-OOH}$ como marcador de exposição, também deve ser feita com cautela, pois este é capaz de sofrer um rearranjo intramolecular dando originando os hidroperóxidos 3β- hidroxicolestano-5-ene-7α-hidroperóxido ($7\alpha\text{-OOH}$) ou 3β-

hidroxicolestano-5-ene-7 β -hidroperóxido (7 β -OOH), produtos formados pela reação do colesterol com espécies radicalares (Girotti e Koritowski, 2000).

Vale ressaltar que, recentemente, o grupo de Wentworth et al (2003) relatou a geração de O₃ em amostras biológicas baseada na oxidação do colesterol formando 3-hidroxi-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al (Csec) e 3-hidroxi-5-hidroxi- β -norcholestan-6-carboxaldeído (ChAld). No entanto, estudos posteriores de Brinckhorst *et al.*, (2008) e Uemi *et al.*, (2009) demonstraram que estes produtos podem ser formados pela ação do ¹O₂ após uma clivagem Hock do 5 α -OOH ou pela decomposição do 1,2 dioxetano formado pelo ataque do ¹O₂ à dupla ligação do C5 (Fig.1.19)

Figura 1.19: Mecanismos de formação de ChAld e Csec pela ação do ¹O₂. Reação com Ch levando à formação do hidroperóxido e/ou dioxetano, decompondo subsequentemente para o aldeído (Uemi *et al.*, 2009).

1.2.4.3.3) Reações com aminoácidos e proteínas

O $^1\text{O}_2$ é capaz de reagir apenas com resíduos de triptofano, histidina, metionina, cisteína e tirosina. De maneira geral, todos os intermediários dessas reações consistem de hidroperóxidos ou endoperóxidos. No caso da histidina, o ataque pelo $^1\text{O}_2$ aparenta levar à formação de um endoperóxido instável no anel imidazólico, através de uma cicloadição nos carbonos 2,5 ou 2,4 (Tomita *et al.*, 1969) (Fig.1.20). Aparentemente, o intermediário após a formação do endoperóxido parece ser um hidroperóxido, como sugerido por Agon e colaboradores (2006). Esses hidroperóxidos instáveis por sua vez decompõem-se para diversos produtos tais como uréia, asparagina e ácido aspártico.

Figura 1.20: Oxidação da histidina via $^1\text{O}_2$. Representação da reação entre o $^1\text{O}_2$ e a histidina, levando à formação de um endoperóxido estável que se decompõe em diversos subprodutos.

O aminoácido tirosina também é oxidado pelo $^1\text{O}_2$ via formação de um endoperóxido intermediário como mostrado na Figura 1.21, o intermediário formado se rearranja dando origem a um hidroperóxido no C1 em seguida decaindo para o seu álcool correspondente (Wright *et al.*, 2002).

Figura 1.21: Oxidação da tirosina via $^1\text{O}_2$. Representação da reação entre o $^1\text{O}_2$ e a tirosina, levando à formação de um endoperóxido instável, que se decompõe em hidroperóxido em seguida estabilizando ao álcool correspondente.

Os produtos primários de oxidação do triptofano, pelo $^1\text{O}_2$, consistem de dois isômeros de hidroperóxidos. Estes por sua vez podem se decompor para os alcoóis correspondentes ou formar N-formilquinurenina (FMK) e 3 α -hidroxipirrolóindol (Fig.1.22).

. Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que os átomos de oxigênio presentes na molécula de FMK são de fato provenientes do hidroperóxido previamente formado através de um mecanismo de clivagem do dioxetano (Ronsein *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que células expostas ao $^1\text{O}_2$ via fotossensibilização, apresentaram níveis elevados de FMK (Ehrenshaft *et al.*, 2009, 2010).

Figura 1.22: Oxidação do triptofano via $^1\text{O}_2$. Representação da reação entre o $^1\text{O}_2$ e o triptofano, levando à formação de um hidroperóxido que se decompõe em FMK. Modificado de Ronsein *et al.*, 2008.

A reação do $^1\text{O}_2$ com os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína ainda foi pouco estudada. No caso da metionina, esta sofre a adição do oxigênio no átomo de enxofre formando um peróxido zwitteriônico que por sua vez reage com uma segunda metionina originando um sulfóxido (Fig.1.23) (Langlois *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 1970; Davies *et al.*, 2004).

Figura 1.23: Oxidação da metionina via $^1\text{O}_2$. Esquema da oxidação da metionina, levando à formação de um intermediário peroxi-zwitteriônico, e subsequente reação com outra metionina.

Cisteínas foto-oxidadas levam à formação dos dissulfetos correspondentes, podendo em alguns casos formar também ácido cisteico (Langlois *et al.*, 1986; Davies *et al.*, 2004)

A reação do $^1\text{O}_2$ com aminoácidos em proteínas, com exceção do triptofano, variam consideravelmente uma vez que a ligação peptídica presente em di e poli peptídeos afeta consideravelmente a reatividade dos substituintes (Ronsein, 2008).

1.2.4.4) Detecção de $^1\text{O}_2$ utilizando captadores químicos

Considerando a reatividade do $^1\text{O}_2$ frente aos diferentes compostos, uma das maneiras de detectá-lo é fazendo uso de captadores químicos, cujo produto de reação possa ser facilmente detectado em baixas concentrações. A eficiência de um captador químico depende principalmente da sua reatividade com $^1\text{O}_2$ e a sua solubilidade no solvente de interesse. A reatividade de uma substância em relação ao $^1\text{O}_2$ também pode ser expressa por seu valor β , sendo esta a concentração de captador na qual 50% do $^1\text{O}_2$ disponível sera capturado (McCall, 1984). Por muito tempo, os captadores mais utilizados foram os derivados do furano (Kreitner *et al.*, 1996) que são oxidados a produtos dicarbonílicos presumidamente via reação Diels-Alder para formar ozonida como intermediário. Embora os derivados de furano sejam altamente reativos com $^1\text{O}_2$, eles apresentam a desvantagem de reagir com outros oxidantes gerando os mesmos produtos observados pela reação com $^1\text{O}_2$ (McCall, 1984). Levando em consideração as propriedades de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, esses podem ser usados como captadores de $^1\text{O}_2$, uma vez que formam endoperóxidos à temperatura ambiente e sua decomposição ocorre somente em temperaturas razoavelmente elevadas (acima de 100°C). Uma das limitações dessas substâncias é a solubilidade em água, porém, esse problema pode ser contornado com modificações na estrutura, adicionando-se grupos que os tornem mais hidrofílicos. A adição de grupos carboxilas é uma opção interessante e

foi usada na obtenção de um derivado hidrofílico do antraceno (Lindig *et al.*, 1980) e do rubreno (Aubry *et al.*, 1981); o inconveniente desses compostos é que eles podem precipitar em solução ácida.

Além desses aspectos, o produto formado da reação do captador com $^1\text{O}_2$ deve ser único; produtos de oxidação do captador com outros oxidantes podem ser tolerados, desde que não gerem o mesmo produto formado pelo $^1\text{O}_2$. O captador e seu produto de oxidação devem ser estáveis para permitir o isolamento para caracterização e detecção em quantidades pequenas.

Derivados de antraceno são modelos interessantes para uso como captador de $^1\text{O}_2$, devido à sua estabilidade, especificidade e por sua facilidade em serem detectados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Um inconveniente dos derivados de antraceno é que eles absorvem luz na faixa do visível e podem agir como fotossensibilizadores e provocar sua auto-oxidação. Derivados de naftaleno não apresentam esse problema, entretanto, esses compostos reagem mais lentamente com $^1\text{O}_2$ e os endoperóxidos obtidos são instáveis. Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novos captadores químicos do $^1\text{O}_2$ capazes de superar as limitações dos captadores já existentes. A Figura 1.24 apresenta as estruturas de diferentes derivados de antraceno; o objeto do presente trabalho, o DADB antraceno-9,10-antracenodiacrilato (B), também está apresentado no esquema.

Derivados de antraceno como captadores químicos em sistemas biológicos foram pouco utilizados. Até o presente momento apenas três trabalhos empregaram essa técnica como indicativa da ação do $^1\text{O}_2$ (Steinbeck *et al.*, 1992 e 1993; Klotz *et al.*, 1999). Todos os trabalhos que utilizaram essa técnica basearam-se no desaparecimento da fluorescência do captador, no entanto é sabido que este não é

um parâmetro inequívoco da sua presença, uma vez que outras espécies são capazes de reagir gerando produtos não fluorescentes. Outro limitante é a baixa sensibilidade desses métodos quando avaliados por perda de fluorescência. Consequentemente se fazem necessárias novas estratégias de detecção para contornar as desvantagens intrínsecas da metodologia.

Figura 1.24: Reação de derivados de antraceno com $^1\text{O}_2$ gerando o respectivo endoperoxido. A) antraceno-9,10-antracenodifenil; B) antraceno-9,10-antracenodiacrilato; C) antraceno-9,10-antracenodimetil; D) antraceno-9,10-divinilsulfonato; E) N,N' -di(2,3-dihidroxipropil)-9,10-antracenodipropanamida; F) sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil}éster de sódio.

1.3) Peroxidação lipídica e hidroperóxidos de lipídios(LOOH)

O estudo do processo da peroxidação de lipídios tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à implicação dos LOOH em diversos processos patológicos como arteriosclerose, degeneração da mácula ocular, doenças neurodegenerativas, diversos tipos de câncer e outras patologias relacionadas. LOOHs são compostos capazes de promover danos em biomoléculas, incluindo proteínas e DNA. Devido a seu tempo de meia-vida elevado estes compostos são passíveis de translocação na célula e entre células. Consequentemente estes compostos podem desencadear seus efeitos em locais distantes dos seus sítios de geração. Outro ponto importante com relação aos efeitos biológicos dos LOOHs que tem sido apenas recentemente estudado é o seu papel nas vias de transdução de sinais.

1.3.1) Formação de LOOH

Hidroperóxidos de lipídios podem ser originados por vias enzimáticas e não enzimáticas

a) Vias não enzimáticas:

As membranas celulares contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), sendo suscetíveis ao ataque por espécies oxidantes. Essa alta suscetibilidade se deve à presença de um hidrogênio bis-aliílico, sendo este mais facilmente abstraído quando comparado aos demais hidrogênios presentes nas moléculas de PUFAs (Fig.1.25).

Figura 1.25: Abstração de H em cadeias lipídicas. Representação da energia necessária para abstração de um H em diferentes carbonos de uma molécula de ácido graxo (modificado de Venkataraman *et al.*, 2004).

A abstração inicial de um átomo de hidrogênio bis-alílico, pode ocorrer em diferentes pontos da cadeia do ácido graxo poli-insaturado, dando início ao processo de peroxidação lipídica. O potencial de redução para o par $L/L^{\bullet}$ é de aproximadamente 0,6V. A remoção do H bis-alílico resulta na formação de um radical centrado no átomo de carbono gerando assim um radical de lipídio ($L^{\bullet}$), este radical por sua vez é estabilizado através de um rearranjo da sua estrutura, formando um dieno conjugado. A reação do O_2 com o radical lipídico é extremamente rápida, de forma que em condições aeróbicas o radical peroxila ($LOO^{\bullet}$) é prontamente formado. O $LOO^{\bullet}$ formado é capaz de abstrair hidrogênios de outros lipídios levando assim a uma reação em cadeia, mas essa reação é bastante lenta apresentando um k ($k=10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que possibilita que antioxidantes como a vitamina E ($k=10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) sejam eficientes terminadores do processo de peroxidação

lipídica (Buettner, 1993). Nesse processo de abstração de H pelos $\text{LOO}^\bullet$, hidroperóxidos (LOOH) são formados como produtos majoritários, (Fig. 1.26) (revisado por Schneider 2009).

Figura 1.26: Peroxidação lipídica. Esquema do processo de lipoperoxidação iniciado por uma espécie capaz de abstrair um H da molécula alvo.

Diferente do processo descrito acima, a peroxidação lipídica mediada por $^1\text{O}_2$ não envolve a presença do radical centrado no carbono. A reação do $^1\text{O}_2$ com as duplas ligações presentes nos ácidos graxos são dadas por uma reação do tipo “ene” resultando na formação direta de hidroperóxidos. Os LOOH formados pela ação do $^1\text{O}_2$ são diferentes dos produtos formados pela peroxidação lipídica iniciada

pela via radicalar. Na Figura 1.27 estão sumarizados os diferentes tipos de hidroperóxidos formados pela oxidação do ácido linoléico.

Figura 1.27: Produtos formados na oxidação do ácido linoléico pelas vias radicalares e não radicalares. 9-OOH corresponde ao ácido 9-hidroperóxi-10,12-octadienoico; 10-OOH ao ácido 10-hidroperóxi-8,13-octadienoico; 11-OOH corresponde ao 11-hidroperóxi-9,12-octadienoico; 12-OOH corresponde ao 12-hidroperóxi-9,13-octadienoico e o 13-OOH corresponde ao 13-hidroperóxi-9,11-octadienoico (modificado de Myamoto, 2003).

b) Vias enzimáticas

Os LOOH também podem ser formados pela ação de enzimas como as lipoxigenases (LOX) (Brash, 1999) e as cicloxigenases (COX) (Hamberg and Samuelson, 1967). O processo catalítico dessas enzimas envolve a abstração do H bis-alílico numa reação altamente específica, resultando numa mistura de isômeros

de LOOH muito mais simples quando comparada aos LOOH gerados pela oxidação radicalar e não radicalar.

Figura 1.28: Representação da reação catalisada pela enzima lipoxigenase.

O mecanismo de catálise das LOX envolve a presença de ferro em seu sítio ativo. Nesse mecanismo, pequenas quantidades de peróxidos são necessárias para converter a enzima do seu estado Fe^{2+} para Fe^{3+} . A enzima nesta forma é então capaz de remover o H bis-alílico formando assim um radical centrado no carbono ($\text{L}^\bullet$) que reage rapidamente com O_2 formando um radical peroxila ($\text{LOO}^\bullet$), o qual já foi demonstrado por técnicas de EPR em fluxo. O ciclo da enzima completa-se com a redução do radical peroxila pelo Fe^{2+} formando o ânion peroxila (LOO^-) que é protonado dando origem ao hidroperóxido (LOOH) e Fe^{3+} (Fig. 1.28)

A produção de $^1\text{O}_2$ na reação catalisada pela LOX foi descrita em 1986 por Kanofsky, nesse trabalho a emissão específica (1268nm) foi monitorada durante a oxidação de ácido linoléico por diversas isoenzimas da LOX.

1.3.1.1) Decomposição de LOOH

O aquecimento de peróxidos de lipídios pode levar a homólise do peróxido gerando produtos radicalares (Eq. 1.20), que por sua vez podem atacar novos lipídios contendo insaturações ou mesmo peróxidos pré-existentes.

Em condições fisiológicas o processo de decomposição destes hidroperóxidos pode ser acelerado pela presença de metais. Os produtos primários gerados por esta reação são radicais alcoxila e peroxila (Eq. 1.21 e 1.22)

A formação destas espécies radicalares acelera a decomposição dos hidroperóxidos podendo levar a formação de uma mistura complexa que inclui compostos como aldeídos saturados, aldeídos insaturados, epóxidos, cetonas entre outros. A Figura 1.29 apresenta a formação do malonaldeído (MDA) através da decomposição de um hidroperóxido. Neste processo a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) leva a formação de um peróxido cíclico que por subsequente hidrólise leva a formação de MDA.

Figura 1.29: Formação de malonaldeído. Esquema demonstrando a formação de malonaldeído após a decomposição de um hidroperóxido contendo mais de uma insaturação.

A formação de radicais alcóxila pode levar a formação de produtos distintos. Radicais alcóxila podem sofrer um re-arranjo devido a sua alta constante de ciclização ($k=10^7 \text{ s}^{-1}$) gerando um radical epoxialílico (Wilcox e Marnett, 1993) que ao reagir com oxigênio formará o radical epoxiperoxila, também capaz de propagar o processo de lipoperoxidação (Fig.1.30). Alternativamente este radical pode rearranjar através de uma cisão β ($k=10^6 \text{ s}^{-1}$), originando radicais centrados no

carbono de tamanhos menores. Estes radicais estabilizam-se originando aldeídos menores (Fig.1.30).

Figura 1.30: Decomposição de hidropéroxidos. Esquema demonstrando a decomposição de hidropéroxidos e os possíveis produtos formados durante este processo.

1.3.2) Consequências da formação e possíveis destinos de LOOH

A introdução de um grupamento hidropéroxido na cadeia lipídica acarretará uma alteração estrutural da membrana plasmática, levando a um distúrbio na

homeostase celular ou pode desencadear respostas celulares de adaptação (Fig. 1.31) (Girotti *et al.*, 2008).

Figura. 1.31: Níveis de peroxidação lipídica e respostas celulares.

Depois de formados, estes compostos podem apresentar diversos destinos. Na ausência de agentes redutores e metais de transição estes compostos podem se acumular e com o aumento da hidrofiliabilidade culminar na alteração estrutural da membrana plasmática, levando a um distúrbio na homeostase celular (Girotti *et al.*, 2004).

Na presença de redutores e metais redox ativos, LOOH podem reagir por reações do tipo Fenton (redução por um elétron) originando radicais peroxila

(detalhado na seção Decomposição de hidroperóxidos). Outra possibilidade envolve a redução por dois elétrons catalisada por enzimas antioxidantes, dando origem ao LAOH. Vale ressaltar que hidroperóxidos de ácidos graxos podem ser reduzidos por sistemas como as GPx, no entanto hidroperóxidos esterificados são detoxificados por vias envolvendo a isoforma 4 da família das GPx, ou mesmo sistemas mais complexos que envolvam a ação sequencial por uma fosfolipase (fosfolipase A2 – PLA2) e consequente redução por alguma das formas da GPx. Fica claro então que o destino de células expostas a LOOH esta intimamente relacionada a essas duas vias (Girotti, 2008) (Fig. 1.32).

Figura 1.32: Vias de redução por um e dois elétrons dos LOOH. Lado esquerdo apresenta redução por 1e⁻ catalizada por metal, acompanhado da adição de O₂ formando o radical peróxido epoxidálico (OLOOH) capaz de desencadear um processo em cadeia. Lado direito representa a redução por 2e⁻ catalizada por enzimas do peroxidases como GPx4, α-GST, e Prx6, levando a formação do álcool correspondente (LOH) (Modificado de Girotti *et al.*, 2008).

1.3.3) Absorção e translocação de ácidos graxos

O mecanismo de absorção de ácidos graxos pelas células bem como sua translocação para outros compartimentos é um processo pouco esclarecido. Os processos de transporte dos ácidos graxos para dentro e no interior de uma célula são tópicos de muitos debates e controvérsias. Alguns estudos apontam para um mecanismo de simples difusão passiva e outros apontam para o envolvimento de proteínas transportadoras (Girotti, 2008; Kamp e Hamilton, 2006).

Com relação ao seu translocamento pode-se esperar que os LOOHs devido a seu elevado tempo de vida bem como sua maior hidrofobicidade (comparado ao ácido graxo original), deveriam capacitar os LOOHs a deslocarem-se de suas membranas de origem e interagir com outros compartimentos celulares (Vila *et al.*, 2000). A Fig 1.33 apresenta de maneira resumida os tipos de deslocamentos possíveis para LOOHs. Um dos deslocamentos mais estudado consiste na translocação de um lado da membrana para outro. Esse tipo de translocação permite a externalização de certos LOOHs. Um dos exemplos mais estudados consiste na translocação da fosfatidilserina peroxidada (PSOOH), onde foi demonstrado que o reconhecimento da PSOOH por macrófagos é uma etapa essencial na remoção de células apoptóticas. (Kagan *et al.*, 2002; Tyurina *et al.*, 2004).

No entanto, LOOHs podem interagir com membrana localizada distantes do sítio de geração. Neste caso como proposto por Girotti *et al.*, (2008) seria esperado que membranas não oxidadas atuariam como um ralo, recebendo via um gradiente de concentração os LOOHs gerados em outros compartimentos. Este tipo de

mecanismo poderia ser aplicado não somente para a translocação intracelular, mas também para a translocação entre lipoproteínas plasmáticas, outras células.

Figura 1.33: Tipos de desloção de LOOH: (Superior) Apresenta a translocação vertical de um LOOH de uma folha da bicamada lipídica para outra. (Central) Demonstra a dissociação de um LOOH de uma membrana, seu deslocamento pela fase aquosa e sua subsequente absorção por uma membrana aceptora em um compartimento diferente da mesma célula. (Inferior) LOOH produzida na membrana de uma célula é dissociado da membrana para fase aquosa com sua subsequente integração na membrana de outra célula (Modificado de Girotti, 2008).

O transporte intracelular/intercelular apresenta duas vertentes, uma apontando para a importância da translocação facilitada por proteínas conhecidas como proteínas carreadoras de ácidos graxos (FABP) e outra vertente enfatizando a

relevância do transporte por difusão passiva (Glatz *et al.*, 1997; Myiamoto *et al.*, 2005). Acredita-se que muitas das características descritas para a translocação dos ácidos graxos também é aplicável para os seus hidroperóxidos correspondentes (Vila *et al.*, 2000; Girotti, 2008). Tal fato já foi relatado para os LAOOH, onde o hidroperóxido apresentou velocidade de translocação semelhante ao composto não oxidado (Ek Von Mentzer *et al.*, 2001). Vale ressaltar que no mesmo estudo, o autor notou que a proteínas FABP apresentaram uma maior afinidade pelos produtos de oxidação, demonstrando possivelmente que estas proteínas poderiam estar envolvidas em um processo antioxidante ou mesmo de sinalização.

Figura 1.34: Possíveis destinos e efeitos de LOOH translocados entre membranas. Na membrana receptora os LOOH translocados podem sofrer redução por um elétron, iniciando o processo de peroxidação lipídica. Alternativamente, a desintoxicação de dois elétrons, pode ocorrer se a capacidade antioxidante é suficiente, por exemplo, GSH/GPx4. Para PLOOHs, PLOHs resultante pode ser hidrolisado e reciclados para restaurar os PL da membrana. Reações de sinalização também podem ocorrer pela oxidação de proteínas sensores como por exemplo a oxidação -CySH para CySOH.

Acreditava-se que os LOOHs eram capazes apenas de exercer seus efeitos nas suas membranas de origem, isto é, o desencadeamento de processos oxidativos produzido, por exemplo, pela fotoxidação de membranas. No entanto a importância do processo de translocação de LOOH de um compartimento membranar para outro tem ganhado bastante atenção nos últimos anos. Consequentemente acredita-se que o processo de translocação estaria intimamente relacionado aos efeitos sinalizadores e tóxicos destas moléculas.

1.3.4) LOOH sinalização e morte celular

O papel dos LOOH tem sido relacionado grandemente com sua capacidade tóxica de gerar espécies radicalares pela redução por $1e^-$. No entanto além de causar danos em biomoléculas estudos recentes tem apontado para o papel dos LOOH como moléculas sinalizadoras mediando respostas específicas como transcrição de genes e ativação/inativação protéica.

Estudos recentes demonstraram que em determinados casos a geração de LOOH originados pela enzima LOX esta envolvida na sinalização celular através da inativação de proteínas tirosina fosfatases (PTP) e consequente aumento na fosforilação do receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Conrad *et al.*, 2010). O mesmo estudo demonstrou que LOOH são cerca de 1000x mais eficientes que H_2O_2 na oxidação das PTP.

O estudo de Jaburek *et al.*, (2004) demonstrou também que os LAOOH podem atuar como reguladores da função mitocondrial. Neste estudo os autores demonstraram que LAOOH podem servir de substrato para a proteína desacopladora-2 (UCP-2) e que a translocação dos LAOOH via um mecanismo de flip-flop estaria diretamente

associado a um maior desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons. Apontando para um controle do tipo feedback na produção de espécies reativas pela mitocôndria.

Recentemente o papel sinalizador direto dos LOOHs no processo de morte celular foi apontado por um estudo de Seiler et al., (2008). No estudo citado foi evidenciado o papel regulador da GPx4 na atividade da LOX por regular o “*peroxide tone*” da membrana. Neste estudo a inativação da enzima GPx4 levou a um acúmulo de peróxidos de lipídios mediada por LOX e a consequente indução da apoptose pela via mitocondrial. Kriska et al., (2006) demonstraram que ChOOH gerados na membrana translocam rapidamente para as mitocôndrias através da proteína carreadora de esterol-2 (SCP-2) levando a um aumento do estresse oxidativo, peroxidação lipídica e morte por apoptose. A proteína SCP-2 além de sua afinidade pelo Chl também apresentou alta afinidade por fosfolipídios e ácidos graxos, fazendo com que esta apresente um papel importante nos processos biológicos desencadeados pelos LOOHs (Falomir Lockhart et al., 2009).

Os mecanismos moleculares da indução de apoptose pelos LOOHs podem ser compreendidos com base nos estudos pioneiros de Kagan et al., (2005), onde estes autores demonstraram que hidroperóxidos de cardiolipina (CLOOH) atuam como intermediários fundamentais no processo de apoptose. Neste estudo foi demonstrado que a oxidação da cardiolipina (CL) pelo citocromo-c (cyt-c) é uma etapa essencial no processo de liberação do cyt-c, culminando na apoptose (Fig. 1.35).

Figura. 1.35 Esquema apresentando a liberação de citocromo-c mediada pela oxidação da Cardiolipina (em vermelho) através da atividade peroxidásica do citocromo-c. O esquema demonstra que ambos, LOOH e H₂O₂ são capazes de induzir a atividade peroxidásica do citocromo-c.

Estudos posteriores demonstraram que a oxidação da CL é mediada pela atividade peroxidásica do cyt-c. Para tal cyt-c utiliza H₂O₂ como substrato para oxidar a CL (Belikova *et al.*, 2006). Recentemente foi demonstrado que hidroperóxidos de ácidos graxos apresentaram uma eficiência 1000x maior que o H₂O₂ na oxidação da CL induzida pelo cyt-c (Belikova *et al.*, 2009).

Recentemente nosso grupo foi capaz de mostrar que o complexo cyt-c/CL foi capaz de gerar ¹O₂. A geração por este complexo ocorre por dois mecanismos distintos, um mecanismo rápido envolvendo a oxidação de CLOOH pré-existentes e um segundo, mais lento, apresentando uma geração contínua e lenta de ¹O₂. Os

mecanismos propostos para essa geração envolvem intermediários peroxilas (mecanismo de Russell) e transferência de energia entre carbonilas excitadas e oxigênio molecular (Miyamoto et al., em revisão).

1.3.5) Danos em DNA promovidos por peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é capaz de gerar compostos capazes de reagir com o DNA, levando a modificações capazes de induzir a morte celular ou mesmo introduzir mutações no genoma (Ferguson, 2010).

O produto primário gerado durante a peroxidação lipídica são os LOOH.

Figura 1.36: Esquema apresentado a oxidação via um elétron desencadeada pelo radical peroxila. Neste mecanismo, a reação inicial da origem ao cátion radical, que sofre uma segunda oxidação e abstração de um H formando 8-oxodGuo.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial genotóxico destes compostos. Plasmídios incubados com LAOOH apresentaram um aumento no número de quebras de fita na presença de metais implicando radicais peroxila e/ou alcóxila nos danos observados (Yang e Schaich, 1996). Park e Floyd (1992) demonstraram utilizando DNA de timo que LAOOH era capaz de induzir a formação de 8-oxodGuo. Evidências em células em cultura também foram obtidas por Kaneko (2000), neste estudo, células expostas a LAOOH na presença de íons ferro apresentaram aumento na quantidade de 8-oxodGuo. O mecanismo para a formação de tal lesão não é claro, mas acredita-se que envolva a formação de radicais peroxila e alcóxila (Fig. 1.36).

Além das espécies radicalares, os hidroperóxidos gerados podem decompor-se originando aldeídos. Como demonstrado por Kawai *et al.*, (2007) LOOH na presença de metais são capazes de decompor originando um mistura complexa de aldeídos entre eles malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), ambos os quais são sabidamente capazes de reagir com o DNA levando a formação de propano e eteno adutos (Marnett, 2001, 2002 e Medeiros, 2009).

Esses aldeídos também apresentam genotoxicidade e são capazes de reagir com a molécula de DNA originando adutos exocíclicos (Fig 1.37). Um grande número de dados sobre este tipo de lesão tem sido acumulado nos últimos anos, as modificações estruturais resultantes incluem a formação de propanos tricíclicos e de eteno adutos, produtos de reações de alquilação e muitas vezes por mecanismos de adição nucleofílica.

Figura 1.37: Lesões em DNA promovidas pela peroxidação lipídica. Representação demonstrando o acúmulo de aldeídos genotóxicos após oxidação de membrana levando ao conseqüente indução de lesões exocíclicas no DNA.

A reação entre aldeídos α,β -insaturados, como HNE, ACR e CRT, leva à formação de propanos cíclicos substituídos (Blair, 2008; Medeiros, 2009; Garcia, 2010). No entanto, aldeídos epoxidados insaturados geram eteno ou eta no cíclico substituídos. A caracterização estrutural desses diversos adutos vem sendo realizada pela análise de produtos de reações entre eletrófilos bifuncionais, aldeídos α,β -insaturados, provenientes da decomposição de peróxidos lipídicos e bases do

DNA ou mesmo com o DNA intacto (Blair, 2008; Carvalho *et al.*, 1998, 2000; Loureiro *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2007) (Fig. 1.38).

Figura 1.38: Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação. (Modificado de Garcia, 2010)

2) Objetivos

Contribuir para os estudos do papel do hidroperóxidos de lipídios em processos citotóxicos e genotóxicos. Este estudo também tem como objetivo contribuir para a identificação do $^1\text{O}_2$ como uma das espécies produzidas em células expostas a hidroperóxidos de lipídios, utilizando técnicas analíticas sensíveis e hidroperóxidos marcados isotopicamente.

Objetivos específicos

Desenvolver uma metodologia baseada em HPLC-MS/MS para a detecção de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos.

Avaliar a produção de $^1\text{O}_2$ por hidroperóxidos de lipídios isotopicamente marcados com oxigênio-18 em sistemas complexos como extratos celulares e células em cultura.

Avaliar os efeitos genotóxicos dos LAOOH e o papel desempenhado por fontes nutricionais de metais na potenciação destes efeitos.

3) Materiais e Métodos

3.1) Materiais

Todos os reagentes utilizados foram da mais alta pureza comercialmente disponíveis.

Soro fetal bovino (SFB) e penicilina potássica foram provenientes da Atena Biotecnologia (Campinas, SP, Brasil). Ácido fórmico, metanol, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido perclórico, acetonitrila, isobutanol, 2-propanol e 2-cloroacetaldeído foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). [15N5]-2'-Desoxiguanosina foi fornecida por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Filtros Ultrafree-Mc (poro: 0,22 µm) pela Millipore (Bedford, MA). Bio-Rad protein assay fornecido pela Bio-Rad Laboratories (Herculas, CA). 2'-desoxiguanosina, ácido linoléico (LA), água deuterada, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de estreptomicina, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e monobásico, tripsina, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), triton X-100, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), butilato de hidroxitolueno (BHT), ácido 2-tiobarbitúrico, brilhante blue G, dimetil formamida, azul de tiazolil (MTT), dimetil sulfóxido (DMSO), fosfatase alcalina, nuclease P1, clorofórmio, carbonato de sódio, ribonuclease A e T1, proteinase K, meio eagle modificado por dulbecco (DMEM), e os demais reagentes não citados foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

A água foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA).

3.2) Equipamentos

Os espectros de absorbância foram adquiridos em um detector de fotodiodos modelo SPD-M10AV ou SPD-M10A/VP da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). As centrifugações realizadas em modelos 5403 e 5408 R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha), Himac CR21E da Hitachi, além da centrífuga para frascos Eppendorfs, não refrigerada. As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um Orbital Incubator Shaker, Gyromax TM 703 (Amerex Instruments, Lafayette, CA) e Termomixer R da Eppendorf. As observações microscópicas foram feitas em um microscópio invertido Diaphot 300 da Nikon (Tokyo, Japão). As soluções foram autoclavadas em autoclave vertical modelo 415 da Fanem (São Paulo, Brasil). As medidas de pH foram feitas em um pHmetro da Corning modelo 320 (Sigma) e PB-11 da Sartorius (Goettigen, Alemanha). As incubações em banho-maria foram feitas em banho modelo 144 da Fanen (São Paulo, Brasil) e 510 DI Delta (Belo Horizonte, Brasil). As células foram incubadas em uma estufa de CO₂ Napco®, modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, Illinois). Foram utilizados, balança analítica da A&D Company (Tokyo, Japan) e balança APX 602 da Denver Instrument (Göttingen, Alemanha) e um módulo para esterilização do ar, equipado com luz UV (EACI/ENVIRCO Environmental Air Control (Albuquerque, NM)).

Os outros equipamentos utilizados serão descritos nas técnicas específicas.

3.3) Desenvolvimento de uma metodologia para detecção de $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares

3.3.1) Síntese do captador dietil 3,3'-(9,10-antracenodiol) bisacrilato (DADB)

Para a síntese do DADB, 5g de 9,10-dibromoantraceno (14,9 mmol), 5g de NaOAc.3H₂O (36.8mmol) e 140mg de CataCxiu[®] (156mmol) foram dissolvidos em um frasco de 250mL de três bocas. Após essa etapa, 5mL de acrilato de etila (46.1 mmol) foram adicionados à reação e a mesma foi mantida por 15h sob refluxo e agitação a 110°C. A solução foi mantida em temperatura ambiente e os resíduos de Pd foram removidos por filtração. O filtrado foi resfriado a 4°C e mantido na geladeira por três dias protegido da luz, ao final desta etapa o precipitado composto de DADB foi filtrado e purificado por recristalização em etanol. O produto formado foi analisado por NMR para atestar sua pureza e eficiência da reação: ^1H NMR (300 MHz, Acetona-*d*₆): δ 8,57 (d, J = 16,02 Hz, 1H), 8,26 (dd, J = 6,80; 3,32 Hz, 2H), 7,61 (dd, J = 6,83; 3,30 Hz, 2H), 6,39 (d, J = 16,07 Hz, 1H), 4,34 (q, J = 7,12 Hz, 2H), 1,36 (t, J = 7,12 Hz, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, Acetona-*d*₆) δ : 15,34 (CH₃), 61,97 (CH₂), 127,24 (CH), 127,90 (CH), 129,66 (CH), 130,32 (C), 132,49 (C), 142,83 (CH), 206,87 (C=O). A reação apresentou eficiência de aproximadamente 80%. (Oliveira *et al.*, 2011).

3.3.2) Síntese do endoperóxido de dietil 3,3'-(9,10-antracenodiol) bisacrilato (DADBO₂)

O padrão de DADBO₂ foi sintetizado por reação da fotossensibilização na presença de azul de metileno (AM). A reação foi realizada em 10mL diclorometano

contendo 50mg de DADB e 100µM de AM. A solução foi irradiada com duas lâmpadas de tungstênio (500 e 600W) com borbulhamento contínuo de O₂ por um período de 90 min a 4°C. Ao término da reação a amostra foi concentrada após secagem sob fluxo de nitrogênio; em seguida separada por extração em fase sólida utilizando colunas C18. A fase móvel utilizada para eluição foram H₂O e MeCN nas seguintes proporções (v/v): 50/50, 40/60 e 30/70. Nestas condições, a reação apresentou uma eficiência de aproximadamente 60%. O produto formado foi analisado por NMR, para atestar sua pureza e eficiência da reação: ¹H NMR (300 MHz, Acetona-d₆): δ 8,06 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 7,38-7,51 (m, 4H), 6,40 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 4,33 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,36 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), ¹³C NMR (300 MHz, Acetona-d₆): δ 14,5 (CH₃), 62,6 (CH₂), 124,44 (CH), 127,87 (CH), 129,06 (CH), 130,32 (C), 132,49 (C), 144,83 (CH), 205,87 (C=O).

3.3.3) Análise dos produtos por HPLC/MS/MS.

As análises dos produtos sintetizados foram realizadas utilizando um sistema de HPLC Shimadzu (Tokyo, Japão) acoplado ao espectrômetro de massa Quattro II (Micromass, Manchester, UK) com uma fonte de ionização atmosférica Z-. Os cromatogramas foram obtidos usando uma coluna Phenomenex Gemini C-18 (250 x 4.6mm i.d, 5µm). A fase móvel utilizada era constituída de água contendo 0,1% de ácido fórmico (solv. A) e acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de ácido fórmico (solv. B). Para eluição dos compostos da coluna, um gradiente de 70% a 100% de B em 10min foi utilizado. O fluxo direcionado para o espectrômetro de massa foi fixado em 0,15mL/min. O detector UV foi setado para monitorar λ=260nm. As análises no espectrometro de massa foram realizadas utilizando a fonte eletrospray em modo

positivo (ESI⁺), a temperatura da fonte foi setada para 100°C para o DADBO₂ e 150°C para o DADB. A temperatura de desolvatação foi de 100°C para o DADB e 250°C para o DADBO₂. O fluxo dos gases de secagem e do nebulizador foram de 300L/h e 15L/h, respectivamente. A voltagem do cone e do capilar foram setadas para 15V e 2.5kV, respectivamente. A fragmentação dos compostos foi realizada utilizando uma energia de colisão de 10eV.

3.3.4) Análises espectroscópicas

Espectro UV-vis foi adquirido em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, e os coeficientes de extinção molar foram determinados em MeCN ($\epsilon_{405} = 13.233\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\epsilon_{220} = 34.208\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente) (Oliveira *et al.*, 2011). Medidas de fluorescência foram realizadas em um equipamento Spex Fluorolog espectrofluorímetro, utilizando um cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0cm.

3.3.5) Reação do DADB com diferentes espécies reativas

As reações do DADB com diferentes espécies reativas foram realizadas em tampão fosfato salino (pH 7.4) e ACN (1:1) contendo 0.1mM de DADB. As reações foram avaliadas por diferentes períodos a 37°C, e a perda de fluorescência foi utilizada como parâmetro de consumo do DADB. DADB foi reagido com as seguintes espécies: ONOO⁻ (1mM), H₂O₂ (10mM), O₂⁻ (gerado por uma solução 10mM de KO₂), ([•]OH) foi gerado utilizando o sistema de Fenton utilizando sulfato ferroso de amônio e peróxido de hidrogênio. ¹O₂ foi gerado pela dissociação térmica de endoperóxido DMNO₂ (50mM). HOCl (1mM) e radicais peroxila gerados pelo 2,2'-

azobis (2-amidinopropano) hidrocloreto (AAPH)(10mM). Além das análises por fluorescência, as amostras ao término da reação foram analisadas por HPLC-MS/MS para avaliar a formação do produto DADBO₂.

O produto específico da reação entre o ¹O₂ e o DADB foi quantificado por HPLC/MS/MS no modo positivo com um espectrômetro API-4000 QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA). DADBO₂ foi quantificado no modo de “multiple reaction monitoring (MRM)”, para tal uma curva de calibração com diferentes concentrações de DADBO₂ foi criada. Para injeção da amostra no espectrômetro foi utilizado um sistema de HPLC Agilent (Kyoto, Japan) constituído de um autoinjeter (1200 High performance), um forno de coluna (1200 G1216B) setado a 18°C, uma válvula automática, uma bomba binária 1200 SL, uma bomba isocrática 1200 SL e um detector UV (1200 DAD G1315C). A coluna utilizada para a separação e análises foi Luna C8 (2) 150x4,6mm com partícula de 5µm (Phenomenex, Torrance, CA). Para eluição do DADBO₂ foi utilizado um gradient de MeCN iniciando com 60 a 95% em 20 min, com fluxo constante de 1mL/min. A transição *m/z* 407/375 [DADBO₂+H]⁺ foi monitorada com um dwell time de 200ms.

3.3.6) Estudos Celulares com DADB

3.3.6.1) Cultivo celular

A linhagem V79 derivada de fibroblastos de hamster foi cultivada em meio DMEM (pH 7,4) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (0,04g/L), sulfato de estreptomicina (0,1g/L) e NaHCO₃ (3,7g/L). O meio foi filtrado com filtro de 0,2µm para eliminar fungos e bactérias. As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ / ar a 37°C. No início da cultura celular, a suspensão de

células foi descongelada e centrifugada a 1000rpm por 2min. No fluxo laminar estéril, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1mL do meio adequado. Após outra centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspensionado em 1mL de meio. A suspensão de células foi transferida para uma garrafa de cultura pequena e mais 9mL de meio foram adicionados. Para o repique das células, o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com PBS-A estéril (NaCl 137mM; KCl 2,68mM; KH_2PO_4 1,47mM; Na_2HPO_4 8mM). Em seguida, as células foram destacadas com 1,5mL de tripsina 0,1% (p/v) e após 2min, 25mL de meio foi adicionado e a suspensão transferida para uma garrafa grande. Para o congelamento das células, 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a 10mL de meio e a suspensão de células foi dividida em 10 *vials*. Os *vials* ficaram 30min no congelador, 24h no freezer a -80°C e foram em seguida estocados em nitrogênio líquido.

3.3.6.2) Determinação da viabilidade celular (MTT)

Aproximadamente 10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços com 100 μL de meio de cultura contendo 10% de SFB e incubadas por 24h em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . Em seguida, o meio foi removido e as células lavadas com PBS, após esta etapa procedeu-se com o tratamento com os diferentes captadores nas células. Após o período de exposição o meio foi aspirado e as células incubadas por mais 2h em 150 μL de meio sem soro + 300 μL 5mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT - 5mg/mL) em PBS-A. O sobrenadante foi removido com cuidado para não aspirar o formazan precipitado, o qual foi ressuspensionado em 200 μL de DMSO. A viabilidade das células foi

determinada pela razão entre as absorbâncias em 570nm obtidas das células tratadas e células controle.

3.3.6.3) Dosagem fluorimétrica de DADB incorporado

As células foram cultivadas em meio de cultura com soro (placa pequena - 3mL de meio de cultura), em atmosfera de 5% de CO₂ / ar a 37°C. Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS-A e incubadas por 1, 3 e 6h em meio DMEM com 10% SBF com diferentes concentrações de DADB (0, 5, 10 e 20μM). Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS-A (descartando-se o sobrenadante), sendo em seguida raspadas da placa com mais 1mL de PBS-A e transferidas para um microtubo. As amostras foram congeladas e descongeladas para rompimento das células, em seguida 1mL de CHCl₃/MeOH (2:1) foi adicionado ao *pellet* celular. A fase orgânica foi coletada e secada. Para a dosagem de DADB incorporado às células, adicionou-se 1000μL de MeOH às amostras antes de transferi-las para a cubeta de fluorescência. Para a dosagem do DADB incorporado às células foi construída uma curva de calibração com amostras padrão de DADB, sendo utilizado $\lambda_{\text{ex}} = 405\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$.

3.3.6.4) Localização subcelular (microscopia confocal)

Para os experimentos de microscopia confocal, as células foram cultivadas em lamínulas de vidro por um período de 24h. Ao final desse tempo o DADB foi adicionado por 3h às células, e os demais marcadores Sytox Green (10nM) e Wheat

Germ Agglutiny conjugado com Alexa Fluor 647 (20nM) foram adicionados nos últimos 30min. Após as incubações, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 10min a 37°C, em seguida as lâminas foram montadas com PBS-glicerol (1%) e levadas ao microscópio (Laica SP-2). As amostras foram excitadas com laser de 405nm para o Sytox Green e o DVDP (vale notar que não há emissão do canal de um fluoróforo no outro). Para o WGA foi utilizado o laser de 532nm.

3.3.6.5) Quantificação de DADBO₂ em células irradiadas na presença de fotossensibilizador

As células foram cultivadas em meio de cultura com soro (placa de 20cm² - 3mL de meio) em atmosfera de 5% de CO₂ / ar a 37°C. Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS-A e incubadas com diferentes concentrações e diferentes tempos com o fotossensibilizador rosa bengala e com 20μM de DADB. Em seguida as células eram irradiadas por diferentes tempos utilizando-se um LED verde de 568nm. Após as irradiações, o PBS foi removido das placas, as células foram raspadas com 1mL de PBS sendo em seguida lisadas por 2 ciclos de congelamento e descongelamento. A porção lipossolúvel foi extraída com CHCl₃/MeOH (1:1), em seguida a fração apolar sofreu uma segunda extração com clorofórmio/água (1:1). A fração apolar foi seca e ressuspensa em acetonitrila e analisadas por HPLC acoplado à espectrometria de massa.

3.3.6.5.1) Metodologia para quantificação de DADBO₂ por HPLC/ESI/MS/MS

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 alimentar manter um fluxo constante para o espectrômetro de massa durante a análise.

As análises foram realizadas com uma coluna phenomenex C8(2) 150mm x 2mm i.d., 5µm com um gradiente de 60% a 95% de acetonitrila em 20min (1mL/min) contendo 0.1% ácido fórmico. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: a 4min, permitindo que o eluente da primeira coluna, que até o momento era descartado, entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massa. O tempo total dessa análise é de 25min.

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).

A quantificação foi realizada criando-se uma curva de um a 250fmol de DADBO₂ e de 100 a 25000fmol para o DADB. Utilizou-se como padrão interno destas análises o endoperóxido do DPA. Este foi adicionado na concentração de 100fmol nas amostras de forma a corrigir possíveis perdas ocorridas durante o processo de extração.

3.4) Produção de $^1\text{O}_2$ via hidroperóxidos de lipídios

3.4.1) Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH)

A síntese de LAOOH foi realizada por fotossensibilização. O balão de reação era composto de uma 100 μL de uma solução 0,1M em metanol, 1g de ácido linoléico dissolvido em 50mL de clorofórmio. A reação foi realizada em um balão imerso em banho de gelo. Esta mistura foi irradiada por duas lâmpadas de tungstênio (500 e 600W) por aproximadamente 5h. A formação de LAOOH foi monitorada por HPLC-UV (235nm) e cromatografia de camada delgada (TLC) em placa de sílica. Alíquotas de 1mL de solução foram aplicadas em placas de sílica com auxílio de uma seringa de HPLC, após secagem das amostras estas foram eluídas com uma mistura de clorofórmio metanol (90:6).

3.4.2) Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18 ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$)

A síntese dos $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ foi realizada por fotossensibilização na presença de azul de metileno em um sistema fechado, saturado com $^{18}\text{O}_2$. Neste sistema, 1g de ácido linoléico foi dissolvido em 50mL de clorofórmio contendo 100 μL de azul de metileno (0,1M em MeOH). A remoção do $^{16}\text{O}_2$ presente no sistema foi realizada por sucessivas etapas de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Terminada esta etapa, o sistema foi conectado a um cilindro de $^{18}\text{O}_2$. A reação teve início na presença de duas lâmpadas (500 e 600W) por aproximadamente 6 h.

3.4.3) Purificação dos hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH)

Os hidroperóxidos de ácido linoléico foram purificados utilizando-se uma coluna de sílica, como descrito por Kuhn et al (1987). A coluna foi preparada utilizando 10g de sílica (seca a 100°C por 2h) equilibrada com hexano. Antes de aplicar a amostra, a mesma foi concentrada em rotoevaporador (~500µL) e em seguida aplicada na coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A eluição da amostra da coluna foi realizada utilizando um gradiente de hexano:éter como demonstrado na tabela abaixo.

Tabela 2: Gradiente utilizado para purificação dos LOOHs formados na fotossensibilização.

Volume (mL)	Hexano:Éter
50	95:5
100	90:10
100	80:20
50	70:30
50	60:40
100	50:50

Foram recolhidas alíquotas de aproximadamente 10mL e analisadas por TLC como descrito no item acima. As alíquotas foram reveladas com ácido sulfúrico, as frações contendo hidroperóxidos foram reunidas em um balão e o solvente foi, em seguida, totalmente evaporado com o auxílio de um roto evaporador. As amostras foram ressuspensas em EtOH, alíquotadas em frações de 500µL e estocadas a – 80°C. Os hidroperóxidos foram quantificados pelo método de Mulliez et al (1997) através da absorbância do dieno conjugado ($\epsilon_{234} = 25000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O valor total foi

corrigido levando em conta que o valor obtido corresponde a 60% dos hidroperóxidos contendo dieno conjugado.

3.4.4) Análise dos LAOOH por espectrometria de massa

Os hidroperóxidos sintetizados foram analisados por espectrometria de massa no modo negativo utilizando *eletrospray* negativo, como fonte de ionização (ESI⁻MS).

Para a análise, 20µL de uma solução 100µM foram injetados em uma coluna LC-18 (Supelco, 150mm x 4,6mm de 5µm). A separação foi realizada utilizando gradiente linear de 70 a 100% de acetonitrila em 10min.

3.4.5) Síntese de hidroxi linoleato LAOH

O hidróxido do ácido linoléico (LAOH e LA¹⁸OH) foi sintetizado através da redução do hidroperóxido correspondente (LAOOH e LA¹⁸O¹⁸OH) por NaBH₄ de acordo com Terao et al. (1988). Para isso, em um tubo de ensaio foi adicionado LAOOH ou LA¹⁸O¹⁸OH em clorofórmio, e a amostra secada em fluxo de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 0,5mL de MeOH gelado contendo 0.5mg de NaBH₄. A mistura foi incubada por 1h a 4°C. Ao término da incubação acrescentou-se 20mL de HCl 4N (pH final 3), 780µL de água e 1mL de CHCl₃. A amostra foi misturada vigorosamente por 1min e a fase orgânica foi transferida para outro tubo, secado e estocado a -80°C. Para incubação com as células, o material foi ressuspensionado em MeOH e quantificado espectrofotometricamente pelo método de Mulliez et al. (1997).

3.4.6) Captação de $^1\text{O}_2$ em modelos celulares

As células utilizadas para estes experimentos foram cultivadas de maneira idêntica a descrita anteriormente

3.4.6.1) Preparo de extratos celulares

Os extratos celulares foram preparados a partir de células V79 que foram ou não tratadas por 24h em meio contendo 1mM BSO. A obtenção desses extratos foi realizada utilizando-se a metodologia descrita a seguir: as células foram removidas das garrafas utilizando uma solução gelada de PBS-A (5mM EDTA). Em seguida as células foram centrifugadas por 5min a 4°C (1000rpm). O pellet celular foi então ressuspenso em tampão 20mM Tris-HCl contendo 0,25M de sucrose e 0.5mM EDTA, pH 7.4. Os tampões utilizados foram dissolvidos em H₂O e em D₂O. A lise das células foi realizada através de sucessivas etapas de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Em seguida os lisados foram centrifugados por 10min a 4°C (12.000rpm) e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford. As amostras foram então aliqüotadas em tubos contendo 100µg/mL de proteína e estocados em freezer -80°C.

3.4.6.2) Determinação da viabilidade celular (MTT)

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito na seção 3.3.6.2.

3.4.6.3) Dosagem de peróxidos (FOX assay)

O tampão de incubação das células foi adicionado à solução de xilenol contendo 25mM H₂SO₄, 100 mM xilenol orange e 250mM sulfato ferroso de amônio em um volume total de 200µl. O pH final da solução foi de ~2. Em outra variação do experimento para avaliar peróxidos lipossolúveis e hidrossolúveis, células após determinado tratamento foram raspadas em PBS-A e em seguida foi adicionado CHCl₃/MeOH (2:1) e as fases orgânicas e aquosas foram coletadas, e em seguida foram avaliadas para a quantidade de peróxidos formados (Gay *et al.*, 1999).

3.4.6.4) Detecção da geração de espécies reativas por DCFH

A medida de espécies reativas geradas em células V79 foi determinada utilizando a probe não específica DCFH (Wang *et al.*, 1999) (Invitrogen). Essa probe é obtida na forma esterificada, forma permeável à membrana plasmática. Após incorporação pelas células, ela é hidrolisada e sendo assim impossibilitada de difundir para fora das células. Na presença de EROs ela é oxidada gerando um produto fluorescente. A medida de EROs gerada por células expostas aos tratamentos foi realizada da seguinte maneira: as células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com 10µM de CM-H₂DCFDA em tampão Krebs–Ringer–Hepes (KRH) (131mM NaCl, 5mM KCl, 1.3mM MgSO₄, 1.3mM CaCl₂, 0.4mM KH₂PO₄, 6mM glicose, 20mM Hepes, pH 7.4) por 30min a 37°C, lavadas 2 vezes com tampão KRG e tratadas com os diferentes compostos testados. A geração de EROs foi monitorada utilizando-se um leitor de microplacas Tecan com excitação e emissão setadas a 485 e 538nm, respectivamente. Os níveis de fluorescência do

controle foram subtraídos dos tratamentos e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4.6.5) Análise de Glutathione

3.4.6.5.1) Tratamento das células e preparo de amostras

As células foram tratadas com BSO por diferentes tempos para avaliar o decréscimo na inibição da síntese de glutathione. Para isso, células V79 foram incubadas por 16, 20 e 24h com 1mM de BSO. Ao fim desse período, as células foram avaliadas para a concentração de GSH. As amostras foram preparadas em 500 μ L (100:1) de fase móvel A. Adicionou-se 250 μ L de ácido metafosfórico 5% e a amostra foi incubada no gelo por meia hora. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10min. Do sobrenadante, foram injetados 10 μ L no HPLC, e retirada alíquota de 100 μ L para posterior dosagem de proteínas.

3.4.6.5.2) Metodologia para Quantificação Simultânea de Glutathione Reduzida e Glutathione Oxidada

Para análise de GSH e GSSG foi utilizado um sistema de HPLC com detecção eletroquímica da ESA. O sistema com bombas modelo 584, detector CoulArray 5600A e um detector UV-Vis SPD-10AV-vp (Shimadzu) foi utilizado com uma coluna Kinetex 2,6 μ C18 100Å (Phenomenex) mantida a 28°C. A fase móvel composta de tampão fosfato de sódio 25 mM com 25 μ M de ácido octassulfônico e 1% de acetonitrila (fase móvel A) e acetonitrila 1% (fase móvel B) com fluxo de

0,7mL/min. As análises foram feitas a 215 nm no detector UV, e a 400, 600 e 950 mV no detector eletroquímico, seguindo o método da Tabela 3.

Tabela 3 – Método de detecção de GSH e GSSG

Tempo	Concentração de B (%)	Ação
0	0	Início da aquisição
8	0	Fim de aquisição
9	100	
10	100	
11	0	
12		Início da limpeza da cela
13		Fim da limpeza da cela

3.4.6.6) Quantificação de DADBO₂ em células e extratos celulares

As células foram cultivadas em meio de cultura com soro (placa de 10cm - 5mL de meio), em atmosfera de 5 % de CO₂ / ar a 37°C (na presença ou ausência de BSO). Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS-A e incubadas com DADB por 3 h, em seguida estas foram concentradas em 1mL de tampão salino de hanks (HBSS). Após as incubações de 15 min (viabilidade de ~85%), as células foram lavadas e o material extraído como descrito previamente. As amostras então foram centrifugadas a 15.000rpm por 15min, e o sobrenadante foi aliquoteado e secado. As alíquotas secas foram ressuspensas em 100µL de fase móvel e injetadas no HPLC. Quantificação foi realizada como descrito na seção 3.3.6.5.1.

3.4.6.7) Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas segundo Bradford (Bradford, 1976), pode ser realizada através da ligação do azul de coomassie à proteína, que absorve luz fortemente em 595 nm.

Posteriormente, preparou-se uma solução para leitura da absorbância (595 nm) que continha 20 μ L de amostra preparada como descrito anteriormente. 80 μ L de solução salina 0,15 M e 5 mL de reagente de dosagem. O branco foi preparado com 100 μ L de solução salina 0,15M e 5mL de reagente de dosagem.

Para a quantificação da massa de proteína em cada placa foi preparada uma curva de calibração com albumina bovina a partir de uma solução estoque 1mg/mL. As amostras da curva foram preparadas com 5mL de reagente de dosagem e 100 μ L de volume final de solução entre estoque de albumina e solução salina, de acordo com a concentração esperada de proteína.

3.5) Estudo da genotoxicidade de LOOH

3.5.1) Cultivo celular

As células SW40 foram cultivadas de maneira idêntica, as V79 com a diferença apenas que a linhagem de colon foi cultivada com 15% de SBF.

3.5.2) Determinação da viabilidade celular

O protocolo para determinação da viabilidade celular foi o mesmo descrito na seção 3.3.6.2.

3.5.3) Quantificação do aduto de MDA-TBA

As células foram cultivadas, até adquirirem confluência de aproximadamente 90% nas placas (6cm de diâmetro), em seguida foram submetidas aos tratamento com concentrações variadas de LAOOH na presença ou não de Hemoglobina. Porém, o meio de cultura adicionado para este tratamento foi solução balanceada de Hanks, já que o grupo fenol presente no DMEM confere ao meio de cultura coloração avermelhada, podendo interferir na detecção do aduto ($\lambda_{\text{excitação}} = 515 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 550 \text{ nm}$).

Após o tratamento, o meio de cultura foi separado das células, as quais foram reservadas para a realização de experimento de dosagem de proteínas. Ao meio de cultura reservado foram posteriormente adicionados 500 μL de solução 0,2% de BHT em etanol 95% e 3mL de solução 0,4% de TBA em HCl 0,2N : H₂O (2:1) (preparada imediatamente antes do uso). Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria por 45min a 90°C. Após esse período, os tubos foram resfriados em gelo e o aduto TBA-MDA (produto rosa) foi extraído com 2,5mL de isobutanol. O aduto de MDA-TBA foi analisado por HPLC com detector de fluorescência em coluna Lichrosorb 10 RP-18 (250mm x 4,6mm, 10 μm) da Phenomenex, a fase móvel foi de 40% de metanol em tampão KH₂PO₄ 25mM pH 7,0, a 1mL/min.

Para a quantificação do aduto MDA-TBA foi feita uma curva de calibração a partir de uma solução estoque de MDA (Esterbauer *et al.*, 1984).

Bisdietilacetal de malonaldeído destilado (220mg, 1mM) foi dissolvido em 100mL de H₂SO₄ 1% (v/v). A solução foi deixada em repouso por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, avolumou-se 1mL dessa solução a 100mL com H₂SO₄ 1% (v/v). A concentração de MDA é determinada medindo-se a absorbância em 245 nm ($\epsilon = 13700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em cubetas de 1 cm, contra branco de 1mL de H₂SO₄ 1%. A curva padrão foi construída preparando-se 1mL das soluções 0,5 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 20 μ M; 40 μ M e 60 μ M a partir do estoque de MDA em H₂SO₄ 1%. Posteriormente, adicionou-se 1mL de solução 0,4% de TBA em HCl 0,2N : H₂O (2:1), e as soluções foram incubadas a 90°C por 45 min. Em seguida, o aduto (produto rosa) foi extraído com isobutanol (v/v). Por fim, a fase isobutanólica foi diluída com metanol (2:1), imediatamente antes da análise por HPLC.

3.5.4) Detecção da geração de espécies reativas por DCFH

O protocolo para determinação da produção de espécies reativas foi o mesmo descrito na seção 3.4.6.4.

3.5.5) Avaliação de peróxidos (FOX Assay)

LAOOH extracelular foi estimado de acordo com o método proposto por Dringen and Hamprecht (1997). Este ensaio baseia-se na capacidade de determinar compostos capazes de oxidar Fe²⁺. Para estes ensaios, 10 μ L do tampão de incubação contendo LAOOH foi coletado em diferentes tempos e adicionado a

190µL 25mM H₂SO₄ em uma microplaca. Após 45min de incubação foi adicionado a esta solução 200µl da solução contendo 0,5 mM [NH₄]₂Fe[SO₄]₂, 200mM sorbitol e 200µM xilenol orange em 25mM H₂SO₄. A absorbância foi lida em um leitor de microplaca (Tecan) a 540nm. A concentração de peróxides intra celulares foi estimada utilizando o método descrito por Gay e Gebicki (2003). Para isto o experimento foi realizado como acima, no entanto a fase apolar foi reagida em meio contendo 1:2 ácido acético:MeOH (G-PCA-FOX), e para a fração polar MeOH foi substituído por H₂O (M-PCA-FOX).

3.5.6) Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)

As células foram cultivadas, como descrito acima. Após adquirirem confluência aproximada de 80% nas placas (3cm de diâmetro), foram submetidas ao tratamento com, LAOOH, Hb ou LAOOH+Hb. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido das placas, as células foram lavadas com 2mL de PBS – A, tripsinizadas e centrifugadas por 8min a 1000rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500µL de PBS-A. Uma alíquota de 20µL desta suspensão (aproximadamente 10.000 células) foi misturada a 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (1% - aquecida a 37 °C). Depositou-se a mistura sobre uma lâmina contendo uma fina camada de agarose normal (1,5% - previamente preparada) e cobriu-se a lâmina com uma lamínula (24x60 mm). Após 10min na geladeira, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01M Tris-base, 0,2M NaOH, pH 10) para outra incubação na geladeira por 90min. As células após a lise foram incubadas por 40min a 37°C na presença de Fpg e Endo III (previamente diluídas no tampão

contendo 40mM HEPES, 0,1M KCl, 0,5mM EDTA, 0,2M BSA, 0,04M KOH, pH 8) para avaliação de modificações oxidativas em purinas e pirimidinas respectivamente. Ao termino da incubação com as enzimas as células foram colocadas na geladeira por 10min para permitir a resolidificação do gel. Para a versão padrão esta etapa é desnecessária (Angeli *et al.*, 2011; Azqueta *et al.*, 2009).

Após esta etapa as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese (dentro de um banho de gelo), onde foram acondicionadas por 20min mergulhadas na solução de eletroforese (0,001M EDTA, 0,3M NaOH, pH 13.5, 4°C) para desnaturação. Em seguida, a cuba foi submetida a 25 V / 300 mA por 20 min.

Ao fim da corrida, as lâminas foram lavadas por três vezes em tampão de neutralização (0,4M base-Tris ajustada com HCl para pH 7.5) por 5min, foram mergulhadas em etanol 100% e coradas com 50µL de solução de brometo de etídio (20µg/mL) imediatamente antes da leitura em microscópio óptico de fluorescência com filtro de 510-560 nm e barreira de 590 nm.

A avaliação do dano nas células foi realizado utilizando-se o software Komet 6.0 (Andor), e o resultados foram expressos em “Olive tail moment”.

3.5.7) Isolamento de DNA celular

Após as incubações, o meio de cultura foi removido, as células ($\sim 2 \times 10^7$) foram lavadas com 10mL de PBS-A e ressuspensas por raspagem em 10mL desse tampão. As suspensões foram transferidas para tubos plásticos de 50mL e centrifugadas a 1500rpm por 5 min a 10°C. Os sobrenadantes foram removidos. A esse precipitado foram adicionados 30mL de tampão A (Sacarose 320mM, MgCl₂ 5mM, Tris-HCl 10mM, desferroxamina 0,1mM, 1% de triton X-100, pH 7,5) e

novamente centrifugados. Após centrifugação a 1500g por 10min, o precipitado foi coletado e ressuspendido em mais 12mL de tampão A. Após nova centrifugação a 1500rpm por 10min, o precipitado foi ressuspendido em 2,4mL de tampão B (Tris-HCl 10mM, EDTA- Na_2 5mM, desferroxamina 0,15mM, pH 8,0) e 140 μL de uma solução de SDS 10%. A esta solução foram adicionados 12 μL de uma solução 10mg/mL de RNase A (preparada em tampão acetato de sódio 10mM e fervida por 15min) e 3,2 μL de uma solução 20U/ μL de RNase T1 (em tampão Tris-HCl 10mM, EDTA- Na_2 1mM, desferroxamina 2,5mM, pH 7,4). A amostra foi incubada a 37°C por 1h e, em seguida, foram adicionados 120 μL de uma solução de proteínase K 20mg/mL. Após incubação a 37°C por 1h e centrifugação a 5000rpm por 15min, o sobrenadante foi coletado, ao qual foram adicionados 4mL de solução de NaI e 8mL de isopropanol. O tubo foi mantido no freezer (-20°C) por uma noite para precipitação do DNA. Em seguida foi feita uma centrifugação a 5000rpm por 15min, o precipitado foi coletado e lavado com 5mL de isopropanol 60% e centrifugado (5000g, 15min). Em seguida os precipitados foram novamente lavados com 5mL de etanol 70% e centrifugados a 5000rpm, 15min. O DNA, depois de seco sob fluxo de N_2 , foi então ressuspendido em 500 μL de mesilato de desferroxamina e sua concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação A_{260}/A_{280} .

3.5.8) Hidrólise de DNA

À 100 μg de foram adicionados 2 μL de uma solução 1,0M de tampão acetato de sódio (pH 5) e 1U de nuclease P1. A mistura foi incubada por 30min a 37°C no

escuro e, em seguida, adicionou-se 6 μ L de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4, 6 μ L de tampão para fosfatase alcalina e 6U de fosfatase alcalina. Seguiu-se a incubação a 37°C por 1h. As amostras foram avolumadas para 100 μ L (Fiala *et al.*, 1989).

3.5.9) Análise de 8-oxodGuo no DNA das células tratadas

DNA, 100 μ g, foram analisadas por detecção eletroquímica num sistema de HPLC acoplado a um detector coulométrico, Coulochem II ESA. O potencial usado na “guard – cell” foi de 900mV e na cela analítica foram selecionados os potenciais 130mV e 280mV, potencial de oxidação da 8-oxodGuo. A separação foi obtida segundo um método isocrático com tampão fosfato de potássio monobásico 25mM, pH 5,5 e 8% de metanol, fluxo 1mL/min, coluna Luna C18 (250 x 4,6mm, 5 μ m). Para a obtenção dos resultados foi feita uma curva de calibração de 8-oxodGuo e 2'-desoxiguanosina. Os resultados foram expressos pela relação entre as quantidades de 8-oxodGuo e dGuo em mols.

3.5.10) Dosagem de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10mL de PBS e ressuspensas por raspagem em 10mL desse tampão. As suspensões foram transferidas para tubos corning, sendo que cada um continha um conjunto de 4 placas e centrifugadas a 1500rpm por 5min a 10°C. Os sobrenadantes foram removidos e as células novamente lavadas com tampão A. A partir deste momento a extração e a hidrólise do DNA procedeu-se como descrito acima. A

formação de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²-εdGuo foi analisada por HPLC acoplado a espectrometria de massa *in tandem*, descrito abaixo.

3.5.1.10.1) Método de quantificação de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²-εdGuo por HPLC/ESI/MS-MS

A metodologia para detecção dos adutos baseou-se no método de Garcia et al., (2010, 2011). 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. As amostras foram inicialmente separadas em coluna analítica Luna C18(2) 250mm x 4,6mm i.d., 5µm (Phenomenex, Torrance, CA), de acordo com o método gradiente descrito na tabela a seguir:

Tabela 4- Gradiente utilizado durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS

<i>Tempo (min)</i>	<i>% de acetonitrila</i>	<i>Fluxo (µL/min)</i>
0	10	650
10	40	200
16	30	200
20	60	200
21	40	200
22	90	650
26	90	650
27	10	650
32	10	650

Uma segunda bomba Agilent (1200 Isocratic pump SL) foi usada para alimentar uma segunda coluna Agilent C18(2) 150mm x 2mm i.d., 3µm com fluxo isocrático (0,2mL/min) de uma solução (60:40) água e acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico, que estava sendo usada para manter um fluxo constante para o

espectrômetro de massa durante a análise. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: a 13min, permitindo que o eluente da primeira coluna, que até o momento era descartado, entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massa, e a 23min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna. O tempo total desta análise é de 32min.

Os adutos foram analisados 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).

Todas as amostras injetadas continham $[^{15}\text{N}_5]\text{-1},N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1},N^2\text{-propanodGuo}$ como padrões internos. As transições m/z escolhidas para os íons $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1},N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $292 \rightarrow 176$ e $297 \rightarrow 181$, respectivamente, e para os íons $1,N^2\text{-propanodGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1},N^2\text{-propanodGuo}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $338 \rightarrow 222$ e $343 \rightarrow 227$, respectivamente.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{H}-2\text{-D-erythro-pentose}]^+$. Sendo que, *curtain gas* (fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente) foi de 25psi, temperatura 450°C, Gás de nebulização e gás auxiliar 60psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray 5500V, gás de colisão alto, aquecimento da *interface heater* ativado em 100°C e o potencial de entrada fixado em 10V. Para as transições $338 \rightarrow 222$ e $343 \rightarrow 227$, foram selecionados 19V de energia de colisão, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 20V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate (declustering potential)* em 51V. Já, para as transições $222 \rightarrow 176$ e $227 \rightarrow 181$ os parâmetros acima foram de 17, 16 e 41V, respectivamente.

3.5.1.11) Determinações de Fe em lisado celular por ICP-MS

Após os tratamentos com Hb, as células foram lavadas 3x com PBS-A, raspadas e as amostras armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. A determinação de Fe em lisado celular por ICP-MS foi utilizado o método de Palmer et al. (2006) com algumas modificações (0,5% v/v HNO_3 + 0,01% v/v de Triton X-100), em meio aquoso. As curvas analíticas foram feitas nas concentrações de 2-10 mg L^{-1} de Fe. O padrão interno utilizado foi o Y na concentração de $50\mu\text{g L}^{-1}$.

4) Resultados

4.1) Síntese e aplicação do DADB para detecção de $^1\text{O}_2$

4.1.1) Síntese do DADB

DADB foi sintetizado a partir de reação de Heck, acoplando 9,10-bromoantraceno ao acrilato de etila utilizando a metodologia descrita por Oliveira *et al.*, (2011). O espectro UV-vis do DADB apresentou duas bandas características centradas em 405 e 260nm (Fig.4.1a); com relação ao seu espectro de fluorescência este apresentou uma intensa emissão em 525 após excitação em 405 nm (Fig.4.1b).

Figura 4.1: Espectro UV-vis (a) e fluorescência (b) de DADB em MeCN.

A Figura 4.2 apresenta um cromatograma típico do produto gerado na reação. O cromatograma UV-vis monitorado a 260 nm apresenta um pico intenso em 15 min (Figura 4.2A), o espectro de massa em 15 min (Figura 4.2B) apresenta o íon do

aduto entre ACN e o DADB m/z 416 ($[\text{DADB}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$), a molécula protonada do DADB com m/z 375 ($[\text{DADB}+\text{H}]^+$) e um fragmento do DADB com m/z 329 ($[\text{DADB}-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}]^+$).

Figura 4.2: HPLC/MS análise da síntese de DADB. (A) Cromatograma UV monitorado em 260 nm.

(B) Espectro de massa ESI^+ obtido em 15.5 min.

4.1.2) Reação do DADB com $^1\text{O}_2$

Nas reações de fotossensibilização utilizando AM, o $^1\text{O}_2$ gerado na reação pode reagir com compostos aromáticos como os antracenos gerando os endoperóxidos correspondente levando à característica perda de absorbância em

405 nm (Pierlot *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2006). Dessa maneira, nós monitoramos a capacidade do DADB de reagir com $^1\text{O}_2$ gerado por uma reação de fotossensibilização na presença de AM. Os resultados para estes experimentos estão apresentados na Figura 4.3.

Figura 4.3: Foto-oxidação do DADB por AM em ACN (A) absorção UV-Vis do DADB e (B) Espectro de emissão de fluorescência do DADB: $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm.

Esses resultados demonstram claramente que o DADB é consumido progressivamente durante a reação de fotossensibilização levando à perda característica da absorção em 405 nm, com consequente perda de emissão em 525 nm. O espectro UV apresenta também um concomitante aumento na faixa de 205 nm, correspondente ao aparecimento do endoperóxido correspondente. Assim,

podemos concluir que o DADB reage com o $^1\text{O}_2$, perdendo sua estrutura antracênica devido à formação do endoperóxido DADBO₂.

A análise por HPLC/MS do DADB após a fotossensibilização está apresentada na Figura 4.4, esta apresenta a formação do íon molecular 407 correspondente à forma protonada do endoperóxido, DADBO₂ [DADBO₂ + H]⁺.

Figura 4.4: Espectro de massa obtido de amostras fotossensibilizadas por 1 hora na presença de AM.

Esses resultados demonstram de forma clara o consumo do DADB com a subsequente formação do seu endoperóxido.

Com o intuito de confirmar se o endoperóxido formado era gerado por $^1\text{O}_2$ e não por uma reação secundária gerada pelo fotossensibilizador, nós utilizamos uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$. Nesses experimentos, foi utilizado o derivado de naftaleno DMNO₂, endoperóxido que é capaz de liberar $^1\text{O}_2$ após sofrer uma termodecomposição. Os resultados desse experimento estão apresentados na Figura 4.5, nesta figura podemos observar 3 picos no UV correspondente ao DADB, ao DADBO₂ e ao DMN (Fig.4.5A).

Figura 4.5: Análise HPLC/MS/MS da reação do DADB (8mM) com DMNO₂ (40mM). (A) cromatograma UV (220 nm) obtido pela seleção do íon *m/z* 407 antes da incubação. (B) Cromatograma obtido pela seleção do íon *m/z* 407 após incubação de 2h com o DMNO₂. (C) Espectro de massa ESI⁺ correspondendo ao endoperóxido (DADBO₂) obtido a 8,6 min. (D) Espectro de fragmentação do íon *m/z* 407 (DADBO₂).

O íon molecular 407 apresentou tempo de retenção de 8,6min (Figura 4.5C). Este íon apresentou um intenso íon de m/z 407, correspondente ao endoperóxido (Fig.4.5C), este mesmo íon quando fragmentado apresentou a perda correspondente a dois átomos de oxigênio, mostrando claramente se tratar do endoperóxido. Desse modo, fica claro que a reação do $^1\text{O}_2$ com o DADB gera exclusivamente o endoperóxido correspondente.

4.1.3) Reação do DADB com diferentes espécies reativas

Para estudos utilizando probes para detecção de espécies reativas, é de vital importância que a reação da probe frente às outras espécies reativas não gere o mesmo produto que com a espécie de interesse.

Figura 4.6: Avaliação da reação do $^1\text{O}_2$ com diferentes espécies reativas. Todas as reações foram acompanhadas por 1 hora, e o consumo do captador foi monitorado pelo desaparecimento da fluorescência.

Tendo isto em vista partimos para avaliar se o DADB era capaz de reagir com outras espécies reativas, para isto incubamos o DADB frente a sistemas geradores de ONOO^- , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ e HOCl . Os resultados dessa série de experimentos estão apresentados na Figura 4.6.

Nessa série de experimentos, monitoramos o consumo de DADB pela emissão de fluorescência em 525 nm. Como podemos observar as únicas espécies capazes de reduzir significativamente a fluorescência do DADB foram HOCl , $^1\text{O}_2$ e em menor proporção o $\cdot\text{OH}$. Visto que outras espécies foram capazes de consumir o DADB, decidimos avaliar se a reação do $^1\text{O}_2$ com o DADB também poderiam levar à formação do endoperóxido. Para isso avaliamos as amostras de DADB após a reação com as diferentes espécies reativas para a formação de DADBO_2 por HPLC-MS/MS. Pode se observar na Figura 4.7 que nenhuma das espécies foi capaz de gerar DADBO_2 após reação com as diferentes espécies.

Figura 4.7: Quantificação do DADBO_2 (m/z 407/374) pelo modo MRM após reação com diferentes espécies reativas.

Nesses experimentos, a reação do DADB foi monitorada utilizando o modo single reaction monitoring (MRM) (transição m/z 407 $\rightarrow$ 374), a concentração foi determinada utilizando uma curva de calibração, e os resultados foram expressos em pmol.

Vale ressaltar que a pequena quantidade de DADBO₂ encontrada nas amostras é devido à auto-oxidação da probe, uma vez que esta na presença de luz é capaz de gerar ¹O₂ consequentemente formando o endoperóxido. Com base nos resultados obtidos podemos confirmar que o DADBO₂ pode ser utilizado como assinatura da geração de ¹O₂.

4.1.4) Incorporação e viabilidade celular em células incubadas com DADB

A próxima etapa do trabalho consistia em avaliar se o DADB poderia ser incorporada por células.

Para essa avaliação, incubamos as células com DADB por diferentes tempos e com diferentes concentrações. Ao final da incubação as células foram lisadas e o DADB extraído e quantificado por fluorescência. A quantificação desse experimento está apresentada na Figura 4.8.

Esses experimentos demonstraram que a incorporação do DADB é dose e tempo dependente. Em seguida, avaliamos a toxicidade do DADB pelo ensaio de MTT. Os resultados mostrados na Figura 4.8 demonstram claramente que o DADB não apresentou toxicidade para as células V79. Portanto para os experimentos subsequentes fixamos os tratamentos das células com 10 μ M de DADB por 3 h.

Figura 4.8: Quantificação de DADB em células incubadas com diferentes concentrações por 3 h (A) e por diferentes tempos com 10 μM. Barras representam a quantificação do DADB nos lisados celulares, enquanto as linhas são representativas da viabilidade celular avaliada pelo método do MTT.

4.1.5) Distribuição intracelular do DADB

Devido ao curto tempo de vida de algumas espécies reativas como é o caso do $^1\text{O}_2$, faz-se necessário determinar a localização subcelular da probe, uma vez que a reação do $^1\text{O}_2$ ocorre próxima ao seu sítio de geração.

Figura 4.9: Micrografias de células incubadas com DADB por 3 h. As imagens são representativas da população celular. A) núcleos de células V79 marcados com Syto-11 B) membranas celulares marcadas com WGA-conjugado à Alexa-678 e C) DADB. D) Sobreposição das imagens.

Dessa maneira, tomamos vantagem da fluorescência intrínseca do DADB para avaliar por microscopia confocal de fluorescência a localização subcelular da probe. A imagem obtida está representada na Figura 4.9. Nesses experimentos marcamos as células com o DADB, Syto-11 (núcleo) e *wheat germ agglutinin* conjugado à Alexa 647 (membrana plasmática).

Ao observar a imagem notamos uma marcação forte e difusa no citoplasma e membrana dessas células, igualmente pudemos notar uma exclusão nuclear.

4.1.6) Quantificação de DADBO₂ em células irradiadas na presença de rosa bengala

Visto que nos resultados obtidos *in vitro*, a utilização da técnica de espectrometria de massa para detecção do DADBO₂ se mostrou altamente sensível e específica, aplicamos o método desenvolvido para a análise de ¹O₂ gerado intracelularmente.

Figura 4.10: Cromatograma típico da quantificação do endoperóxido de DADB (DADBO₂), através de HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem no modo MRM. Figuras A, B e C correspondem, respectivamente, a DPAO₂, DADB e DADBO₂. Painel esquerdo correspondendo a células não irradiadas e painel direito as células irradiadas na presença de RB.

Nesses experimentos o $^1\text{O}_2$, gerado através da reação de fotossensibilização na presença de RB, foi captado pelo DADB e o produto formado foi quantificado por HPLC/MS/MS utilizando-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) acompanhando a transição $407 \rightarrow 374$. Estão representadas na Figura 4.10 as transições monitoradas (363/330 – DPAO₂; 375/255 – DADB; 407/374 – DADBO₂).

A metodologia descrita utiliza o DPAO₂ como padrão interno. A utilização do padrão interno possibilita a correção de possíveis perdas de material geradas durante a extração do produto. Vale notar, que a utilização de um padrão isotopicamente marcado seria o mais adequado, no entanto por não possuímos o captador marcado isotopicamente, optamos pela utilização de um composto com características similares (Miyamoto *et al.*, 2003a).

A quantificação de DADBO₂ gerado na fotossensibilização na presença de RB está demonstrada na Figura 4.11. Células foram tratadas com 5 μM de RB por 30min e em seguida irradiadas com laser verde. Os resultados desses experimentos demonstraram um aumento dependente do tempo de irradiação na formação de DADBO₂.

No mesmo experimento pode se notar que a quantidade de DADBO₂ gerada apresentou um aumento quando realizadas na presença de D₂O, um potenciador do tempo de vida do $^1\text{O}_2$ (Rodgers e Snowden, 1982). Na presença de licopeno (1 μM), a formação de $^1\text{O}_2$ foi diminuída demonstrando o potencial do licopeno como um eficiente antioxidante frente ao $^1\text{O}_2$ (Di Mascio *et al.*, 1989).

Nota-se que em todos esses experimentos não houve um consumo total do DADB, uma vez que este também era detectado juntamente com as amostras, conforme Figura 4.10, o que nos indica que nem todo o captador estaria disponível para reação com o $^1\text{O}_2$.

Figura 4.11: Quantificação de DADBO₂ em amostras fotossensibilizadas na presença de 5 μ M de RB. Células foram pré-incubadas com RB por 30min e em seguida foram lavadas e ressuspensas em PBS em H₂O ou D₂O. Células com licopeno foram tratadas por 1h com o carotenoide antes da fotossensibilização. * p < 0,05 em relação aos respectivos controles, n=3.

Percebe-se também que no tempo zero houve uma geração de ¹O₂, o que aponta para uma possível oxidação da probe durante o processo de extração. Consequentemente acarretando uma possível superestimação da quantidade de ¹O₂ gerado.

Esses resultados nos mostram que a utilização de derivados de antraceno em combinação com a técnica de espectrometria de massa é uma técnica promissora para detecção de ¹O₂ gerado em sistemas biológicos. Mas, devido à sua alta sensibilidade, cuidados no processo de extração devem ser tomados de forma a minimizar oxidações no processo de manipulação da amostra.

4.2) Efeitos celulares do $^1\text{O}_2$

4.2.1) Citotoxicidade de $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização

Nossos estudos também objetivaram avaliar os efeitos celulares desencadeados pela geração intracelular de $^1\text{O}_2$. Na Figura 4.12A estão apresentados os resultados da viabilidade de células irradiadas na presença de $5\mu\text{M}$ de RB. Nesses experimentos podemos observar um decréscimo na viabilidade celular após 5min de irradiação; valores de viabilidade se aproximaram de 60% após 20min de irradiação. Com o intuito de avaliar o papel do tripeptídeo GSH na modulação da viabilidade celular, as células foram pré-incubadas na presença do inibidor da síntese de glutatona, BSO e com N-acetilcisteína (NAC).

A Figura 4.12B demonstra que o pré-tratamento com BSO foi capaz de diminuir os níveis intracelulares de GSH (~30% do valor do controle) e a NAC foi capaz de aumentar ligeiramente a concentração de GSH (20% de aumento em relação ao controle). Os resultados dos experimentos de viabilidade das células pré-tratadas com os moduladores dos níveis de GSH esta apresentado na Figura 4.12C. Demonstrou-se nesses experimentos que a diminuição nos níveis GSH levaram a uma sensibilização das células frente ao efeito tóxico do $^1\text{O}_2$, conduzindo a um decréscimo na viabilidade de ~ 75% no controle para valores de ~50% nas células pré-tratadas com BSO. Na mesma série de experimentos, a utilização do antioxidante N-acetil-cisteína (1mM), apresentou um efeito protetor na morte celular induzida por $^1\text{O}_2$ aumentando os níveis de viabilidade celular para ~90%.

Figura 4.12: A) apresenta os dados de viabilidade de células expostas a 5 μ M de RB e irradiadas por diferentes tempos; viabilidade foi avaliada pelo método do MTT 24h após irradiação. B) Quantificação dos níveis de glutathione em células incubadas com 1mM de BSO e 1mM de NAC por 24h. C) Efeito de BSO e NAC na morte celular induzida por RB; células foram pré-incubadas com 1mM BSO e 1mM NAC por 24h antes da irradiação. D) Efeito de tampões deuterados na morte celular induzida por fotossensibilização na presença de RB.

As reações utilizando fotossensibilizadores podem produzir outras espécies além do $^1\text{O}_2$, devido à capacidade desses compostos sofrerem reações de fotossensibilização do tipo I e II. Com o intuito de avaliar se o efeito tóxico do fotossensibilizador era mediado por $^1\text{O}_2$, as irradiações foram realizadas em D_2O . A Figura 4.12D mostra claramente isso, nela é possível observar um decréscimo na viabilidade em células fotossensibilizadas na presença de D_2O .

4.2.2) Geração de $^1\text{O}_2$ e formação de peróxidos

Para investigar o efeito da depleção de GSH no processo de morte induzida por $^1\text{O}_2$, nós utilizamos o método descrito anteriormente utilizando a captador DADB para avaliar possíveis diferenças na geração de $^1\text{O}_2$ nos sistemas tratados com BSO e NAC. A Figura 4.13A apresenta os resultados da quantificação de $^1\text{O}_2$ avaliado como geração do produto específico DADBO₂. Nesses experimentos podemos observar que apesar de uma discreta proteção do NAC (~150 fentomol) e de um pequeno aumento de DADBO₂ em células tratadas com BSO (~190 fentomol) não houve diferença significativa na produção de $^1\text{O}_2$.

Uma vez sabido que grande parte das reações do $^1\text{O}_2$ com biomoléculas leva à formação do hidroperóxido correspondente, nós avaliamos a formação desses peróxidos após fotossensibilização na presença de RB. Os resultados estão presentes na Figura 4.13B, os quais apresentam um perfil semelhante aos encontrados para a formação de DADBO₂. Podemos observar uma tendência de acúmulo de um maior número de peróxidos em células tratadas com BSO, porém não havendo diferença significativa entre a quantidade de peróxidos encontrados.

Investigamos nesse mesmo sistema, se os peróxidos encontrados eram gerados via $^1\text{O}_2$. Os resultados do ensaio estão apresentados na Figura 4.13C. Pudemos notar um aumento significativo na quantidade de peróxidos em células irradiadas em D₂O (~10 μM), de modo análogo, células pré-incubadas com licopeno apresentaram quantidades inferiores (~2,5 μM) de peróxidos quando comparadas às células controle (~6 μM). A Figura 4.13D representa a utilização de um protocolo modificado, pelo qual é possível determinar a concentração de peróxidos em frações aquosas e orgânicas. Esse tipo de protocolo nos permitiu diferenciar, de forma não

específica, peróxidos proteicos (fase aquosa) e peróxidos lipídicos (fase orgânica). Nota-se nesse experimento que após a fotossensibilização com RB há uma quantidade de peróxidos similar nas duas frações, entretanto a fração orgânica apresenta valores ligeiramente maiores. No mesmo sistema o pré-tratamento com BSO e NAC não alterou a concentração de peróxidos gerados nas frações analisadas. Entretanto, o pré-tratamento com 5 μ M de licopeno levou a um decréscimo significativo na concentração de peróxidos na fração orgânica (~1,5 μ M) em relação às células fotossensibilizadas na presença de RB (~3,5 μ M).

Figura 4.13: A) quantificação de DADBO₂ em células pré-tratadas com 1mM de BSO e 1mM de NAC e irradiadas na presença de 5 μ M de RB. B) avaliação da concentração de peróxidos em células pré-tratadas com BSO e NAC (1mM) em diferentes tempos de irradiação. C) efeito de tampões deuterados e licopeno na formação de peróxidos em células irradiadas com 5 μ M de RB. D) quantificação de peróxidos em frações aquosas e orgânicas gerados pela fotossensibilização de RB (5 μ M) em células pré-tratadas com 1mM de BSO, 1mM de NAC ou 5 μ M de licopeno.

4.2.3) Efeito da Glutationa na remoção de peróxidos gerados por $^1\text{O}_2$

Tendo em vista que a modulação nos níveis de GSH afetou fracamente a produção de $^1\text{O}_2$ e a formação de peróxidos, decidimos investigar a cinética de remoção de peróxidos totais. Os resultados dos experimentos estão apresentados na Figura 4.14. Células tratadas com BSO apresentaram uma clara diminuição na remoção dos peróxidos quando comparada às células controle e pré-tratadas com NAC. Na Figura 4.14A, observa-se que 3h após a fotossensibilização a quantidade de peróxidos nas células tratadas com BSO está em 90%; enquanto os valores para as células controle e tratadas com NAC estão em aproximadamente 60%. Nota-se também que após 6h, esses valores tornam-se iguais para todas as condições avaliadas.

Figura 4.14: A) cinética de remoção de peróxidos gerados pela irradiação de células V79 na presença de 5µM de RB. Células foram pré-tratadas com 1mM de BSO e NAC antes da irradiação. B) avaliação da remoção dos peróxidos nas frações aquosas e orgânicas das células fotossensibilizadas, peróxidos foram medidos 3h após a irradiação.

Nesse mesmo experimento foram avaliadas as concentrações de peróxidos nas frações orgânicas e aquosas. A Figura 4.14B apresenta os resultados de peróxidos restantes 3h após as células tratadas serem irradiadas com BSO e NAC.

Para todas as frações, as células tratadas com BSO apresentaram valores de peróxidos maiores, reforçando uma remoção mais lenta desses compostos. Nota-se também que os peróxidos presentes nas frações aquosas são mais lentamente removidos quando comparados com as frações orgânicas.

4.2.4) Efeito do ferro no processo de decomposição de peróxidos em células fotossensibilizadas

Sabendo-se que metais são capazes de potencializar os efeitos tóxicos de hidroperóxidos através de reações de decomposição, decidimos testar se os peróxidos gerados durante a reação de fotossensibilização poderiam tornar as células mais sensíveis quando expostas ao Ferro.

Os resultados desses ensaios estão apresentados na Figura 4.15. A Figura 4.15A apresenta a viabilidade das células irradiadas na presença de 5 μ M de RB por 5min.

Nota-se nesses experimentos que células previamente irradiadas (consequentemente com maior acúmulo de peróxidos) apresentaram uma maior suscetibilidade à exposição a 10 μ M de Fe₂SO₄ quando comparadas às células que não haviam sido irradiadas. O mesmo modelo foi utilizado para a determinação de espécies reativas; para isso se utilizou a probe não específica DCFH. Os resultados estão apresentados na Figura 4.17B, na qual se observa que as células irradiadas e expostas ao metal apresentaram uma quantidade aumentada de espécies capazes de oxidar o DCFH.

Figura 4.15: Avaliação do efeito da exposição das células a FeSO₄ após fotossensibilização na presença de 5 μ M de RB. A) avaliação da viabilidade celular e B) formação de espécies reativas, monitorada pela oxidação do DCFH.

4.2.5) Efeito protetor de carotenóides na citotoxicidade induzida por ¹O₂

Nos experimentos anteriores ficou demonstrada a capacidade do ¹O₂ gerado pela fotossensibilização do RB em induzir morte celular, bem como a possível implicação de alguns intermediários (hidroperóxidos) gerados pela reação do ¹O₂ com biomoléculas no seu papel tóxico/sinalizador.

Figura 4.16: Avaliação do efeito protetor de carotenóides em células fotossensibilizadas na presença de 5 μ M de RB. A) viabilidade de células V79 foi avaliada 24h após irradiação na presença de 5 μ M de luteína ou licopeno. Carotenóides foram adicionados 1h antes da irradiação ou adicionados após a irradiação. B) Quantificação do DADBO₂ formado em células pré-tratadas com 5 μ M de carotenóides.

Devido à alta eficiência dos carotenóides de desativar o $^1\text{O}_2$, decidimos avaliar se aqueles seriam capazes de inibir a morte celular no sistema utilizado. Para tal, foram avaliados dois carotenóides, o licopeno e a luteína. Na Figura 4.16A pode-se notar que esses dois compostos quando previamente incubados nas células tornaram as células mais resistentes aos efeitos tóxicos induzidos pelo $^1\text{O}_2$. A adição desses compostos após a irradiação não apresentou efeito protetor. Utilizando o DADB como trapeador para o $^1\text{O}_2$ foi possível evidenciar que a quantidade captada é significativamente menor nas células pré-tratadas com os dois carotenóides (Fig.4.16B).

Neste sistema também foi avaliado o papel dos carotenóides no processo de formação e remoção de peróxidos. A quantidade de peróxidos formadas no sistema foi significativamente menor nas células irradiadas na presença de licopeno e luteína (Fig.4.17A).

Figura 4.17: (A) Avaliação da concentração de peróxidos em células pré-tratadas com luteína e licopeno (5µM) em diferentes tempos de irradiação. (B) Cinética de remoção de peróxidos gerados pela irradiação de células V79 na presença de RB. Células foram pré-tratadas com 5µM de luteína ou licopeno por 1h antes da irradiação.

Foi avaliado também se esses carotenóides poderiam influenciar na cinética de remoção dos peróxidos em questão. O resultado da Figura 4.17B mostra que os carotenóides testados não apresentaram nenhum efeito visível na remoção desses peróxidos.

4.3) Geração de $^1\text{O}_2$ via hidroperóxidos

4.3.1) Síntese de LAOOH

Tendo em vista a importância dos hidroperóxidos nos efeitos biológicos do $^1\text{O}_2$, a próxima etapa do trabalho consistiu em estudar os efeitos celulares dessas moléculas. Para isso, utilizamos como modelo os hidroperóxidos de ácido linoleico.

Figura 4.18: Formação de LAOOH em reações de fotossensibilização na presença de AM. (A) Análise por cromatografia de camada delgada de amostras fotossensibilizadas por diferentes tempos (0 – 5h). (B) Análise de absorção em 235nm de amostras fotossensibilizadas por diferentes tempos (0 – 5h).

A síntese dos hidroperóxidos foi realizada por fotossensibilização na presença de AM. Nessa reação, o $^1\text{O}_2$ gerado reage com ácido linoleico por uma reação do tipo “ene” formando hidroperóxidos. A formação desses compostos pôde ser monitorada por cromatografia de camada delgada ou pela característica absorção dos dienos conjugados em 235nm. Os resultados dos experimentos de fotossensibilização do ácido linoleico estão apresentados na Figura 4.18. Nos experimentos de cromatografia de camada delgada podemos notar 3 bandas, que correspondem ao LA, LAOOH e LA(OOH)₂. Como se pôde notar, há uma conversão do LA em LAOOH e LA (OOH)₂ com o passar do tempo de irradiação.

A síntese dos hidroperóxidos marcados com oxigênio-18 foi realizada em um sistema fechado saturado com oxigênio-18. Após a reação de fotossensibilização, as amostras de hidroperóxidos marcados ou não marcados foram separadas por cromatografia líquida com coluna de sílica, as frações contendo os hidroperóxidos

foram separadas e a presença dos hidroperóxidos foi verificada por espectrometria de massa (Fig.4.19).

Figura 4.19: Espectro de massa obtido no modo negativo das amostras de LA fotossensibilizadas na presença de oxigênio-16 e 18.

Na Figura 4.19A está apresentado o cromatograma do LA fotossensibilizado na presença de oxigênio-16. Nesse espectro de massa pudemos observar a presença de dois picos intensos, um de m/z 311 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e outro 293 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$,

correspondendo ao íon do LAOOH e a perda de uma molécula da água, respectivamente. A Figura 4.19B apresenta o espectro de massa do LA fotossensibilizado na presença de oxigênio-18; observamos um acréscimo de 4 unidades de massa, correspondendo à inserção de 2 átomos de oxigênio marcado na molécula de LA. O outro íon correspondendo a uma perda de 20 unidades de massa representa a perda de uma molécula de água marcada. Esses dados demonstram que a nossa síntese foi bem sucedida na produção dos hidroperóxidos marcados e não marcados.

Figura 4.20 Fragmentação do LA¹⁸O¹⁸OH (A) e (B) LAOOH. C) Esquema de fragmentação dos principais isômeros de posição do LAOOH.

Os fragmentos gerados pelos compostos sintetizados também foram fragmentados de forma a podermos ter uma análise mais detalhada dos produtos. Para isso, as massas correspondentes aos hidroperóxidos foram selecionadas no primeiro quadrupolo e em seguida fragmentadas na câmara de colisão e analisadas no segundo quadrupolo. Os espectros dos fragmentos gerados estão apresentados na Figura 4.20. Os fragmentos observados resultam da perda consecutiva de água e quebra da dupla ligação alílica ao grupamento peroxila. Para os hidroperóxidos marcados ocorre a perda de uma molécula de água marcada deixando apenas um átomo de oxigênio-18 na molécula inicial. Este tipo de fragmentação gera um perfil característico de fragmentos de m/z 113/115, 153/155, 183/185 e 223/225 derivados dos isômeros do LAOOH/LA¹⁸O¹⁸OH que contêm o grupamento hidroperóxido nas posições 13,10, 9 e 12 respectivamente (Miyamoto et al., 2003b)

4.3.2) Citotoxicidade dos LAOOH

Para avaliar o efeito tóxico dos LAOOH, células foram incubadas na presença do hidroperóxido por tempos e concentrações diferentes (Fig.4.21A). Os resultados desses experimentos mostraram que os LAOOH apresentaram um efeito citotóxico, tempo e dose dependentes. Dando continuidade a esses experimentos, as células foram pré-incubadas com BSO por 24h e com mercaptosuccinato (MS) por 1h. Em seguida foi adicionado 100 μ M de LAOOH por 24h. Os resultados desses ensaios estão apresentados na Figura 4.21B. Células expostas a 100 μ M de LAOOH apresentaram cerca 60% de viabilidade. A pré-incubação das células com BSO e MS levou a um aumento da toxicidade dos LAOOH, uma vez que células pré-

tratadas apresentaram níveis de viabilidade próximos de 30%. A incubação com BSO e MS não apresentou aparente efeito na viabilidade das células.

Figura 4.21: Avaliação da citotoxicidade do LAOOH em células V79. (A) Células V79 foram expostas a diferentes concentrações de LAOOH por tempos variando de 0 a 48h, resultados estão expressos em % em relação ao controle. (B) Efeito do pré-tratamento com 1mM de BSO e 100 μM de MS na citotoxicidade induzida por 100 μM de LAOOH (24h).

4.3.3) Geração de $^1\text{O}_2$ em extratos celulares

Sistemas *in vitro* demonstraram que $^1\text{O}_2$ poderia ser gerado através da decomposição de hidroperóxidos contendo C- α pelo mecanismo de Russell, de

modo a expandir esses resultados decidimos avaliar a formação dessa espécie em sistemas mais complexos.

Figura 4.22: Produção de ¹O₂ via LAOOH em extratos celulares. Efeito de diferentes concentrações de LAOOH na produção de ¹O₂ em H₂O (A) e D₂O (C). Papel da função peróxido para a formação de ¹O₂ via LAOOH; extratos foram incubados com 100μM de LA, LAOH e LAOOH em H₂O (B) e D₂O (D) na presença ou não de 100μM de FeSO₄. ND= não detectável.

Extratos celulares foram preparados como descrito no item materiais e métodos. Os extratos celulares foram preparados de células controle e células pré-tratadas com BSO. Para esses experimentos, extratos correspondendo a 5x10⁶ células foram usados para cada condição. O captador foi adicionado diretamente aos extratos na concentração de 20μM. Tendo em vista resultados prévios, nos quais a utilização de LAOOH não apresentou diferença na produção de DADBO₂, concluímos que, possivelmente, a quantidade gerada não seria suficiente para

evidenciarmos um efeito significativo devido à contaminação por DADBO₂. Nesses experimentos, as células foram tratadas com concentrações variando de 10 a 1000 μM de LA¹⁸O¹⁸OH com adição ou não de 250 μM de Fe₂SO₄. Os resultados da produção de ¹O₂ por hidroperóxidos em extratos celulares estão apresentados na Figura 4.22.

A produção de ¹O₂ nos experimentos foi avaliada como a produção de DADB¹⁸O₂. A formação do produto foi feita utilizando a técnica de HPLC-MS/MS no modo MRM monitorando a transição 411/374. Os resultados desses ensaios mostraram que há uma produção de ¹O₂ marcado dependente da dose de LA¹⁸O¹⁸OH, pôde-se notar também que a produção da espécie é aumentada na presença de Fe²⁺ e de D₂O (Fig.4.22 A e C). Essa produção de ¹O₂ é dependente do peróxido uma vez que incubações com o LA e o LAOH não foram capazes de gerar DADB¹⁸O₂ (Fig.4.22 B e D).

No mesmo sistema, testamos o efeito de diferentes metais com diferentes potenciais de redução na formação do DADB¹⁸O₂ com os resultados dos experimentos apresentados na Figura 4.23.

Podemos observar nestes experimentos que o tipo de metal e a concentração desse influenciam na geração de ¹O₂ (Fig.4.24a), sendo o Ce⁴⁺ o metal mais eficiente quando comparado ao Fe²⁺ e ao Cu⁺. Devido à importância do ferro em sistemas biológicos, expandimos os estudos para avaliar se o estado de oxidação do ferro poderia influenciar na produção de ¹O₂ por LOOH. Para isso, extratos foram incubados com diferentes concentrações do L¹⁸O¹⁸OH com subsequente adição de 250 μM do metal. Os resultados desses ensaios estão demonstrados na Figura 4.24B, tais dados mostram claramente que a produção de ¹O₂ via LAOOH é mais eficiente para os sistemas contendo Fe²⁺ do que em sistemas contendo Fe³⁺.

Figura 4.23: Papel de diferentes metais na formação de $^1\text{O}_2$. (A) Extratos celulares foram incubados com $100\mu\text{M}$ de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ em tampão deuterado na presença de diferentes concentrações de Fe^{2+} , Cu^+ e Ce^{4+} . (B) Efeito de diferentes estados de oxidação do ferro na formação de $^1\text{O}_2$ via LAOOH; extratos foram incubados com diferentes concentrações de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ na presença de $100\mu\text{M}$ de Fe^{2+} ou Fe^{3+} .

Para investigar o papel da GSH e de sistemas antioxidantes dependentes de GSH na produção de $^1\text{O}_2$ induzida por LAOOH, utilizamos extratos de células tratadas com BSO, nas mesmas condições dos experimentos de fotossensibilização (1mM de BSO por 24h). Os resultados desses experimentos estão apresentados na Figura 4.24. Extratos de células, nas quais a síntese de GSH foi inibida apresentaram uma taxa de remoção de LAOOH diminuída quando comparadas com os extratos das células controle (Fig.4.24A). Nesse sistema, adicionamos Fe^{2+} em dois períodos diferentes, logo após adição do LAOOH e 30min após a adição de LAOOH. Após adição do ferro, as células foram incubadas por mais uma hora e a quantidade de $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$ foi medida (Fig.4.24B). Esses experimentos mostram que os extratos depletados de GSH apresentaram nos dois tempos utilizados menores níveis de $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$. Extratos incubados por 30min antes da adição do Fe^{2+} também

apresentaram menores níveis de $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$, tanto para extratos controle como para extratos pré-incubados com BSO.

Figura 4.24: Papel de GSH e GPx na formação de $^1\text{O}_2$ via $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. Cinética de remoção de LAOOH em extratos de células pré-tratadas com BSO (1 mM) (A) ou MS (100 μM) (C). Formação de $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$ foi monitorada 0 ou 30min após adição do LAOOH aos extratos de células pré-tratadas com BSO (B) ou MS (D), seguido de adição de 100 μM de FeSO_4 .

Com intuito de verificar se sistemas antioxidantes dependentes de GSH também poderiam modular a geração de $^1\text{O}_2$ gerado por LAOOH, os extratos celulares foram incubados previamente por 10min com mercaptosuccinato (MS) um inibidor inespecífico de GPx. Extratos celulares incubados com 100 μM de MS apresentaram uma deficiência na remoção de LAOOH quando comparado com os extratos não tratados (Fig.4.24C). $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$ foi quantificado nesse sistema utilizando o mesmo protocolo descrito para o BSO.

Desse modo, extratos foram incubados com 100 μ M LA¹⁸O¹⁸OH por 0 e 30min antes da adição de 250 μ M de Fe²⁺ (Fig.4.24D). Nesses experimentos de formação de DADB¹⁸O₂ foi evidenciado que a pré-incubação por 10min com MS não alterou a geração de DADB¹⁸O₂ no tempo zero. Porém em extratos incubados por 30min a condição contendo MS apresentou valores maiores para DADB¹⁸O₂.

4.3.4) Geração de ¹O₂ em células em cultura

Uma vez que extratos celulares são sistemas muito simplificados, nos quais não existem mais uma compartimentalização celular, analisamos a geração de ¹O₂ gerada por LAOOH em células previamente incubadas com o trapeador DADB. Nesses experimentos monitoramos a formação do endoperóxido utilizando três transições: a transição 411/374 correspondendo ao endoperóxido com dois átomos de oxigênio-18; a transição 409/373 correspondente ao endoperóxido com um átomo de oxigênio 18 e um átomo oxigênio 16 e por último a transição 407/374 referente ao endoperóxido contendo dois átomos de oxigênios 16. Células expostas aos captadores e sem adição de LA¹⁸O¹⁸OH não apresentaram as transições 411/374 e 409/374 correspondentes à adição de dois átomos de oxigênios marcados e um átomo de oxigênio marcado e um não marcado, respectivamente (Fig.4.25A e 4.25B). A Figura 4.25C está demonstrado a presença do endoperóxido contendo 2 oxigênios não marcados.

Figura 4.25: Células incubadas apenas com DADB sem adição de $LA^{18}O^{18}OH$ monitorando as transições correspondendo à adição de dois átomos de oxigênio-18 (A); um oxigênio 18 e um oxigênio 16 (B) e dois oxigênios 16 (C) ao DADB. D) Representa o cromatograma UV-vis das amostras.

Os resultados das células expostas ao $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ estão apresentados na Figura 4.26. Ao analisar os dados fica claro que foi possível detectar a formação do endoperóxido em todas as transições selecionadas, correspondendo às adições de dois, um ou nenhum átomo de oxigênio marcado (Fig.4.26 A-G). Na transição correspondendo ao endoperóxido sem nenhum átomo de oxigênio 18 não é possível verificar nenhuma diferença entre as amostras contendo LAOOH e LAOOH + Ce^{4+} . No entanto ao analisarmos os produtos da adição de um ou dois átomos de oxigênios marcados é possível verificar a existência de uma diferença entre as células tratadas com 100 μM de LAOOH (Fig.4.26A e 4.26B) e 100 μM de LAOOH + Ce^{4+} (Fig.4.26E e 4.26F) (células sem adição de hidroperóxido não apresentaram sinal nas transições 411/374 e 409/374 - Fig.4.26)

Figura 4.26: Quantificação de DADBO₂ em células incubadas com DADB mais adição de LA¹⁸O¹⁸OH (a-d) ou LA¹⁸O¹⁸OH + Ce⁴⁺ por 30 min, monitorando as transições correspondendo a adição de dois átomos de oxigênio 18; um átomo de oxigênio-18 e um átomo de oxigênio-16 e dois átomos de oxigênio-16 ao DADB.

4.4) Avaliação da toxicidade de LAOOH em células de câncer de cólon

4.4.1) Citotoxicidade dos LAOOHs em células SW480

Dada a grande concentração ingerida de LAOOH por pessoas com uma dieta rica em lipídios, nós avaliamos a toxicidade deste composto em uma linhagem de câncer de cólon. Neste mesmo modelo foi também investigada a possível interação com uma fonte de ferro presente na dieta, a hemoglobina (Hb).

A viabilidade das células SW480 foi avaliada pelo ensaio do MTT e os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 4.27. Nestes experimentos as células foram incubadas com concentrações variáveis de LAOOH (0-200 μ M) por 6, 24 e 48h (Fig.4.27. A, C e E respectivamente). Foi possível observar que o LAOOH foi tóxico para as células em concentrações superiores a 50 μ M, neste mesmo sistema observamos que o pré-tratamento das células com Hb (50 μ M) potenciou a citotoxicidade induzida pelo LAOOH. De modo a validar o efeito do metal e do peróxido experimentos controles com apo-Hb e LAOH foram realizados (Fig.4.27. B, D e F). Para isto, células pré-tratadas por 30min com Hb ou apo-Hb foram expostas a 100 μ M de LAOOH ou LAOH por 6, 24 e 48h. A viabilidade celular nestes experimentos demonstrou-se inalterada para o LAOH bem como para o pré-tratamento com a apo-Hb, enfatizando assim o papel do peróxido e do metal para a toxicidade deste composto.

4.4.1.2) Lipoperoxidação e estado redox celular

Utilizando os mesmo protocolos de tratamento descritos na seção anterior, foi avaliada a indução de peroxidação lipídica através da quantificação de MDA. Os

resultados destes ensaios estão apresentados na Figura 4.28A, os experimentos demonstraram que LAOOH induziu a peroxidação lipídica de forma dose dependente, e que este efeito era potencializado pela Hb.

Figura 4.27: Viabilidade celular. Células foram pré-tratadas com 50 μM por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LA e LAOOH (0-200 μM) por 6 (A), 24 (C) e 48h (E), ao final do período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT, como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e da função peróxido foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb e apo-Hb e após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas à 200 μM LAOOH ou LAOH por 6 (B), 24 (D) e 48h (F). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

Os resultados apresentados são dependentes de peróxido e metal como comprovado pelo uso de LAOH e a apo-Hb (Fig. 28B).

Figure 4.28: Peroxidação lipídica avaliada pelos níveis de MDA. Células foram pré-tratadas com 50μM de Hb por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LAOOH (0-50μM) (A). Em seguida foram quantificados os níveis de MDA como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e da função peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb ou apo-Hb. Após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas a 50μM LAOOH ou LAOH por 1h (B). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média ± desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ p<0.05). (*) Estatisticamente diferente de células não expostas à Hb; (+) Estatisticamente diferente de células não expostas ao LAOOH.

De maneira semelhante, avaliamos o estado redox celular através da probe fluorescente DCFH. Similar aos resultados obtidos na peroxidação lipídica, a oxidação do DCFH também foi dependente da concentração de LAOOH e a pré-incubação com Hb potencializou esses efeitos (Fig. 4.29A), sendo esses dependentes do peróxido e do metal presente na enzima (4.29B).

Figure 4.29: Avaliação do estado redox celular pela probe DCFH. Células foram pré-tratadas com 50 μM de Hb por 1h e após remoção do meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações de LAOOH (0-50 μM) (A). Em seguida o estado redox celular foi avaliado pela oxidação celular da probe DCFH, como descrito na seção de materiais e métodos. Adicionalmente, o efeito do heme e da função peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com Hb ou apo-Hb. Após remoção do meio de cultura as mesmas foram expostas a 50 μM LAOOH ou LAOH por 1h (B). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média ± desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ p<0.05). (*) Estatisticamente diferente de células não expostas à Hb; (+) Estatisticamente diferente de células não expostas ao LAOOH.

4.4.1.2) Genotoxicidade

Células SW480 foram susceptíveis aos efeitos tóxicos do LAOOH, também demonstrando-se mais sensíveis ao peróxido quando pré-incubadas com Hb. De maneira a estender esses resultados, decidimos avaliar se LAOOH era capaz de induzir danos ao DNA. Para tal, avaliamos os efeitos genotóxicos do LAOOH, da Hb e da pré-incubação com Hb seguida de exposição ao LAOOH. Como parâmetro para avaliar os efeitos tóxicos destes utilizamos o ensaio cometa em sua versão padrão e a versão utilizando as endonucleases Fpg e EndoIII. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 4.30.

Analizando a Figura pode-se observar que células incubadas com Hb apresentaram, na versão padrão do cometa, apenas danos em concentrações superiores a 100 μ M (Figura. 4.30A). A adição de Fpg e EndoIII possibilita a conversão de bases oxidadas em quebras, as quais podem ser visualizadas pelo ensaio cometa. O uso das enzimas possibilitou a detecção de oxidações no DNA em concentrações superiores a 50 μ M (Figura 4.30B, desta forma optou-se para os protocolos de pré-incubação por concentrações que não foram capazes de induzir quebras e oxidações.

Células incubadas com concentrações de 0 a 100 μ M de LAOOH não apresentaram aumento no número de quebras (Figura 4.30C). A adição de Fpg demonstrou um aumento no número de sítios Fpg sensíveis em células incubadas com 50 μ M de LAOOH. Os tratamentos consistindo de um período de 30min de pré-incubação com 50 μ M de Hb apresentaram um efeito aditivo no número de quebras e de modificações oxidativas nas bases do DNA induzidas por LAOOH (Figura 4.30 E e F, respectivamente).

Figura 4.30: Genotoxicidade da Hb, do LAOOH e sua combinação. Para a versão alcalina do cometa, as células foram tratadas com várias concentrações de Hb (0-250 μM) (A), LAOOH (0-100 μM) (C). Para o tratamento em combinação as células foram pré-tratadas com 50 μM de Hb e após remoção do meio de cultura LAOOH (0-50 μM) foi adicionado (E). Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para a versão modificada do cometa (avaliação de lesões oxidativas) o mesmo protocolo foi utilizado e as concentrações seguintes (B) Hb (0-100 μM), (D) LAOOH (0-50 μM) e pre-tratamento (F). As análises foram realizadas utilizando um sistema semi-automatizado (KOMET 6.0). Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Resultados estão apresentados como *Olive tail moment*. Barras representam média $\pm$ desvio padrão. Significância estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$).

Para confirmar o envolvimento do LAOOH e do metal presente na Hb realizamos experimentos pré-tratando as células com Hb ou com apo-Hb. Em seguida as células foram tratadas com LAOOH ou LAOH. Os resultados destes

experimentos demonstram que apenas a Hb foi capaz de potencializar o efeito genotóxico do LAOOH e que LAOH não apresentou genotoxicidade no sistema estudado (Figura 4.31A).

Figura 4.31: Efeito da função e heme nos danos em DNA induzidos pelo sistema Hb/LAOOH. O efeito do heme e da função peróxido também foram avaliados pré-tratando as células por 1h com 50 μ M de Hb ou apo-Hb. Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio do cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para cada ponto experimental foram realizados três experimentos independentes e 50 células analisadas. Resultados estão apresentados como Olive tail moment. Significancia estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p < 0.05$). (*) Estatisticamente diferente comparado à Hb; (+) estatisticamente diferente comparado a EtOH e LAOH. B a D apresentam micrografia representativas de células cometa pré-tratadas com 50 μ M Hb por 60min e subsequentemente tratadas com EtOH, 50 μ M LAOH e 50 μ M LAOOH respectivamente.

Dado a alta susceptibilidade das células pré-tratadas com Hb aos danos oxidativos causados pelo LAOOH, nós quantificamos a lesão 8-oxodGuo no sistema em estudo.

Figura 4.32: Quantificação dos níveis de 8-oxodGuo. Para todos os experimentos as células foram pré-tratadas com 50 μ M Hb (ou não) por 1h, na sequência o meio de cultura for substituído por meio novo contendo 50 μ M LAOOH. Representação de um cromatograma contendo 100 μ g de DNA. (A) Cromatograma UV ($\lambda=265$ nm) das amostras apontando para os picos da timidina (Thd), citidina (dCyd), guanosina (dGuo) and adenosina (dAdo). B) Representação de um cromatograma obtido no detector eletroquímico, apontando para o pico da 8-oxodGuo. (C) Quantificação dos níveis de 8-oxodGuo nos tratamentos descritos. Para cada condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Barras representam média $\pm$ desvio padrão. Significancia estatística foi avaliada pelo teste two-way ANOVA (*/+ $p<0.05$). (*) Estatisticamente diferente das células controle dR= 2-deoxyribose.

Os experimentos para quantificação de 8-oxodGuo através de HPLC-ECD estão apresentado na Figura 4.32. A Figura 4.32A apresenta o cromatografa UV do DNA hidrolisado, destacando a presença dos nucleosídeos timidina (Thd), citidina (dCyd), guanosina (dGuo) e adenosina (dAdo). A presença de 8-oxodGuo é monitorado no canal do detector eletroquímico (Figura 4.32B). Os resultados da quantificação de 8-oxodGuo estão apresentados na Figura 4.32C, onde é possível notar um aumento de aproximadamente 3x no número de lesões induzidas no

sistema Hb/LAOOH (~10 lesões por 10^6 dGuo) em relação ao controle (~3 lesões por 10^6 dGuo). Células tratadas com Hb e LAOOH sozinhos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Dando continuidade a estes experimentos, objetivamos quantificar neste sistema a formação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo. Para tal, utilizamos uma metodologia ultra-sensível baseada em HPLC/MS/MS (descrita na sessão de materiais e métodos) que possibilita a quantificação acurada dos dois adutos em uma mesma análise. Na Figura 4.33 esta representando um cromatograma típico destas análises. Como é possível observar a mesma análise permite o monitoramento simultâneo do 1, N^2 - ϵ dGuo (Figura 4.33A) e o 1, N^2 -propanodGuo (Figura 4.33C), bem como seus respectivos padrões marcados isotopicamente (Figura 4.33 B e D). A Figura 4.33E esta representando o cromatograma UV-vis destas amostras. Destacando o sistema de válvula (Figura 4.33F) que permite o descarte dos nucleosídeos entrando apenas as bases modificadas no espectrômetro de massa. Este tipo de abordagem possibilita um aumento no limite de detecção do equipamento. A quantificação dessas amostras esta apresentada na Figura 4.34. Observa-se que as células pré-tratadas e expostas a LAOOH apresentaram níveis elevados de 1, N^2 - ϵ dGuo, estes níveis mantiveram-se inalterados para células pré-tratadas com apo-Hb e expostas ao LAOOH ou LAOH. Com relação ao 1, N^2 -propanodGuo nenhuma diferença pode ser evidenciada em nenhuma das condições testadas. Como se pode observar nos ensaios acima, a pré-incubação com uma fonte de metal foi importante para a potenciação do efeito tóxico do LAOOH. Consequentemente avaliamos o efeito de diferentes tempos de incubação com Hb nas lesões oxidativas induzidas pelo LAOOH (Figura 4.35).

Figure 4.33: Cromatograma HPLC/ESI/MS-MS de uma amostra de 100 μ g DNA de células SW480.

(A) $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$: m/z 292/176; (B) $[^{15}\text{N}_5]\text{-}1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$: m/z 297/181, (C) $1,N^2\text{-propanodGuo}$: m/z 338/222; (D) $[^{15}\text{N}_5]\text{-}1,N^2\text{-propanodGuo}$: m/z 343/227.] (E) DNA hidrolisado enzimaticamente ($\lambda=260\text{nm}$). (F) Esquema apresentando a válvula utilizada para injeção das amostras no massa. dR= 2-desoxirribose.

Figura 4.34: Formação de adutos exocíclicos. Células foram pré-tratadas com 50μM Apo-Hb ou Hb por 1h e em seguida após troca do meio de cultura foram adicionados 50μM LAOOH ou LAOH por 1h. A quantificação dos adutos 1,N²-εdGuo (A) e 1,N²-propanodGuo (B), foi realizada como descrito na seção de materiais e métodos. Para condição experimental, três experimentos independentes foram realizados. Baras representam média ± desvio padrão. Significancia estatística foi avaliada utilizando two-way ANOVA (*p<0.05). (+) Estatisticamente diferente da Hb; (*) estatisticamente diferente do LAOH.

A incubação com 50μM de Hb levou a um acréscimo nos níveis intracelulares de ferro, atingindo um platô após aproximadamente 60 min (Figura 4.35A). Células expostas a diferentes tempos de incubação com Hb apresentaram um acréscimo nos níveis de bases oxidadas como é possível evidenciar na Figura 4.35B, é possível notar também que tempos de incubação superiores a 2h levaram a

uma diminuição nos níveis dessas lesões. Ao correlacionar o número de lesões e o aumento na concentração intracelular de ferro nos primeiros 90min, é possível observar uma forte correlação (Figura 4.35C e D), indicando um importante papel nos níveis de ferro na oxidação do DNA causada por LAOOH.

Figure 4.35: Concentração de Ferro e danos em DNA. Para todos os experimentos as células foram pré-tratadas com 50 μ M de Hb por diferentes períodos de incubação, na sequência as células foram lavadas e foi adicionado 50 μ M de LAOOH. (A) Concentração de Ferro nos lisados de células incubadas com 50 μ M de Hb por diferentes periodos. (B) Avaliação nos níveis de oxidação do DNA através da versão modificada do ensaio cometa (digestão com Fpg e Endo III). Após o tratamento seguiu-se para a avaliação de danos em DNA pelo ensaio do cometa como descrito na seção de materiais e métodos. Para cada ponto experimental foram realizados três experimentos independentes e 50 células analisadas. Resultados estão apresentados como *Olive tail moment*. Correlação dos níveis de sítios sensíveis a Fpg e ENDO III com a concentração de ferro (C e D respectivamente). E a H representam micrografias representativas das condições pré-incubadas com 50 μ M de Hb por 0, 15, 60 e 240min e subsequente adição de 50 μ M de LAOOH.

5) Discussão

5.1) Utilização do DADB como molécula repórter para a produção de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos

A utilização de probes para a detecção de espécies reativas tem sido aceita como uma metodologia confiável para a detecção dessas espécies em processos biológicos. No entanto a falta de conhecimento sobre como essas espécies se comportam em sistemas complexos pode levar à interpretação errônea dos resultados obtidos (Wardman, 2007).

Desde a descoberta do fotobleaching do rubreno, um grande número de compostos aromáticos como naftalenos, antracenos, pentacenos, hexacenos e azantracenos têm sido utilizados como captadores de $^1\text{O}_2$ (Oliveira *et al.*, 2011). Além dos derivados de antracenos, recentemente, outras metodologias baseadas em probes para a detecção do $^1\text{O}_2$ têm sido descritas na literatura. Esses compostos normalmente apresentam moléculas de antraceno ligadas a grupo contendo anéis xantínicos. A reação do $^1\text{O}_2$ com a porção antracênica altera o estado de conjugação do sistema liberando a fluorescência da porção xantínica (Umezawa *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2001; Nagano, 2009). No entanto, essas probes apresentam algumas desvantagens como, por exemplo, a dificuldade em serem obtidas em grandes quantidades devido a sua síntese ser composta por varias etapas. Vale ressaltar que a aplicação dessas probes em sistemas biológicos ainda não foi relatada.

O estudo da geração do $^1\text{O}_2$ em sistemas complexos como células em cultura tem como ferramenta básica o uso de potenciadores/supressores (Greter-Beck *et al.*,

1996, 2000) e também a utilização de biomarcadores (Zareba *et al.*, 2005; Minami, *et al.*, 2008, 2009). A utilização de supressores/potenciadores é uma opção de fácil uso, no entanto a aplicação desta deve ser feita com cautela dado a sua baixa especificidade. No caso do uso dos biomarcadores, o uso de produtos de oxidação do colesterol e do ácido linoléico são as metodologias mais utilizadas (Zareba *et al.*, 2005; Minami, *et al.*, 2008, 2009). O uso destes marcadores restringe a detecção do $^1\text{O}_2$ nas regiões apolares das membranas celulares. Outros limitantes incluem a instabilidade destes compostos que podem ser facilmente degradados durante o processo de isolamento, bem como a velocidade de reação do $^1\text{O}_2$ com estas moléculas, apresentando constantes de reação na ordem de $0,6 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Vever-Bizet *et al.*, 1989).

Com relação aos estudos prévios utilizando derivados de antraceno em sistemas biológicos, poucos trabalhos na literatura utilizaram essas moléculas como repórteres da geração de $^1\text{O}_2$ (Klotz *et al.*, 1997, 1999; Steinbeck *et al.*, 1992, 1993). Todos os estudos utilizando esses derivados basearam suas medidas no decaimento da fluorescência. Como mostrado no presente estudo, medidas baseadas no decaimento de fluorescência, apesar de poderem ser usadas como um parâmetro de geração de $^1\text{O}_2$, não são medidas inequívocas da sua geração, uma vez que outras espécies reativas são capazes de reagir gerando produtos não fluorescentes.

Na literatura, a reatividade de derivados de antraceno frente ao $^1\text{O}_2$ aumenta com a presença de grupos doadores de elétrons ($\text{H} < -\text{C}_5\text{H}_6 < -\text{CH}_3 \sim -\text{CH}_3\text{O}$). Algumas moléculas utilizadas como captadores como por exemplo o DMA e o DPA apresentam um $k_r = 21 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ respectivamente. Resultados recentemente publicados pelo nosso grupo demonstraram que o DADB apresenta um

$k_r = 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Oliveira et al., 2011). As constantes de velocidade de supressão obtidos foram semelhantes aos outros derivados do antraceno. Com o acoplamento de um grupamento etil acrilato ao anel antracênico houve um aumento na densidade eletrônica do antraceno, tornando o DADB cerca de duas vezes mais reativo que DPA e 20 vezes mais reativo que antraceno. Além disso, Nardello et al., (2005) utilizaram a o acoplamento de Heck para obter um captador químico solúvel em água (AVS - Fig. 1.24D) . Este derivado iônico apresenta duas ligações duplas exocíclicas como substituintes no anel antracênico, apresentando um k_r de $4,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em D_2O . Outro derivado, sem as ligações duplas, o EAS (Fig. 1.24F), apresentou um k_r duas vezes menor que o do AVS ($2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em D_2O), demonstrando que a presença de ligações duplas nos braços dos substituintes aumenta a densidade eletrônica e consequentemente aumenta a reatividade do anel antracênico frente ao $^1\text{O}_2$. (Oliveira et al., 2011)

O presente trabalho apresentou como uma das suas metas o desenvolvimento de uma metodologia confiável para a detecção de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos. Para tal, o derivado de antraceno DADB foi utilizado como uma sonda para monitorar a geração de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos. Foi demonstrado neste estudo que o produto gerado entre a reação do DADB com o $^1\text{O}_2$ leva à geração do endoperóxido correspondente. Este produto demonstrou ser exclusivo da reação entre o DADB e o $^1\text{O}_2$. Outras espécies testadas como, por exemplo, o HOCl e o $\cdot\text{OH}$ foram capazes de reagir com o DADB, no entanto não levaram à formação do DADBO₂. Como consequência, DADBO₂ pôde ser utilizado como assinatura da geração de $^1\text{O}_2$. Nossos resultados também mostraram que o DADB é uma molécula facilmente incorporada pelas células e sua acumulação intracelular não apresentou efeitos citotóxicos. Essas características tornam esta molécula uma ferramenta

interessante para o estudo do $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares. Pode-se concluir que a utilização do DADB aliado à técnica de HPLC-MS/MS apresenta potencial para se tornar uma ferramenta importante no estudo do papel do $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos principalmente devido à facilidade de sua síntese em grandes quantidades, ser facilmente incorporado sem apresentar efeitos de toxicidade celular aguda, bem como sua reação ser capaz de produzir um produto único, estável e capaz de ser detectado facilmente.

5.2) Fotocitotoxicidade, formação de $^1\text{O}_2$ e peróxidos: efeito protetor de GSH e carotenóides

Nos experimentos de foto-oxidação celular, utilizamos o fotossensibilizador RB como molécula geradora de $^1\text{O}_2$. Com o auxílio da metodologia utilizando DADB foi possível demonstrar que a citotoxicidade induzida pelo RB é correlacionada com a formação de DADBO₂. Implicando o $^1\text{O}_2$ como a espécie responsável pelo efeito fototóxico desse composto. Nesses experimentos, podemos observar também que a GSH apresenta um papel importante na proteção contra a morte induzida pelo fotossensibilizador. Estudos já demonstraram que $^1\text{O}_2$ é capaz de reagir com GSH gerando uma série de produtos de oxidação, como por exemplo, dissulfetos, ácidos sulfênicos, sulfínicos, sulfônicos entre outros (Devasagayam *et al.*, 1991). Consequentemente, no nosso modelo seria esperado que uma diminuição nos níveis de GSH levasse a um aumento na quantidade de DADBO₂ nas células que tiveram a síntese da GSH inibida. No entanto, não houve essa diferença. Esse dado ainda é reforçado pelos experimentos de formação de peróxidos, os quais também não apontaram uma diferença significativa em células pré-tratadas com o

BSO. Esses dados nos mostram que a GSH apresentaria um papel secundário como trapeador direto do $^1\text{O}_2$. Entretanto, a maior sensibilidade das células pré-tratadas com o BSO ao processo de foto-oxidação pode ser justificada pela diminuição na sua capacidade de remover os peróxidos formados. Recentemente foi descrita uma via de morte celular onde GSH/GPx4 atuariam governando a atividade da enzima LOX-12,15 (Seiler *et al.*, 2008). Nesse modelo, níveis diminuídos de GSH (por consumo deste ou mesmo inibição de sua síntese) diminuiriam a atividade da enzima GPx4 levando a um acúmulo de peróxidos na membrana, assim alterando o “peroxide-tone” culminando no aumento de atividade da LOX. Apesar de mais estudos serem necessários para avaliar se tal mecanismo é aplicável às células sob processo de foto-oxidação, o modelo seria de certa forma justificável, uma vez que nossos dados mostram que as células pré-tratadas com BSO tendem a formar e a acumular peróxidos em frações apolares (possivelmente peróxidos de lipídios). A Figura 5.1 apresenta os possíveis mecanismos pelos quais os sistemas dependentes de glutathione poderiam estar protegendo as células durante o processo de fotootoxidação.

Reforçando essa hipótese, a utilização de antioxidantes apolares como os carotenóides foram capazes de proteger as células contra a morte induzida por $^1\text{O}_2$. No caso dos carotenóides, é sabido que esses apresentam uma constante de desativação física do $^1\text{O}_2$ na ordem de 10^8 - 10^9 (Di Mascio e Sies., 1989; Di Mascio *et al.*, 1990), essas moléculas quando adicionadas às células foram capazes de diminuir a formação de DADBO₂ bem como a formação de peróxidos.

Aparentemente, esse efeito inibitório culminou com o aumento no número de células viáveis após a irradiação com RB. A utilização do licopeno mostrou-se capaz de reduzir eficientemente a peroxidação de ambientes apolares, como demonstrado

nos experimentos de dosagem de peróxidos em fase orgânica e aquosa. Esses dados reforçam a importância de eventos peroxidativos em ambientes de membrana, esta observação é reforçada pelo fato de que células fotossensibilizadas na presença de licopeno apresentaram diminuição na formação de peróxidos nas frações orgânicas, porém não nas frações polares. Indicando, que para a morte celular desencadeada pela irradiação do RB os eventos peroxidativos nas frações apolares teriam uma maior toxicidade em comparação aos produtos formados nas frações polares.

Figura 5.1: Esquema indicando os possíveis processos pelos quais a glutathione poderia estar protegendo as células durante o processo de foto-oxidação. Seta tracejada representa um mecanismo secundário de proteção.

Reforçando a hipótese que intermediários reativos são formados após a fotossensibilização, o estudo de He et al., (2008) mostrou que espécies radicalares são formadas após adição de metais e que a produção destes radicais colocaliza com o fotossensibilizador. A Figura. 5.2 apresenta os possíveis mecanismos pelos quais os carotenóides poderiam estar protegendo as células durante o processo de fotoxidação.

Figura 5.2: Esquema indicando os possíveis processos pelos quais os carotenóides poderiam estar protegendo as células durante o processo de fotoxidação.

Reforçando a importância dos intermediários gerados no processo de fotoxidação, células fotossensibilizadas apresentaram uma maior sensibilidade à morte celular induzida por adição de Fe_2SO_4 . Esse resultado era esperado uma vez que metais são capazes de acelerar a decomposição dos hidroperóxidos a compostos mais reativos como é o caso de radicais peróxila e alcóxila, bem como produtos não radicalares como aldeídos, cetonas e epóxidos. Incubações com células pré-tratadas com BSO reforçam essa hipótese, uma vez que células com uma quantidade maior

de peróxidos formariam uma quantidade maior desses compostos quando expostos ao metal. Os produtos tóxicos gerados pela decomposição dos hidroperóxidos como o caso dos aldeídos são detoxificados por sistemas dependentes de GSH/Glutathione transferase. Consequentemente outro mecanismo plausível para a morte acentuada em células pré-tratadas com BSO seria o comprometimento da detoxificação dessas espécies e consequente ataque dessas espécies a diversas biomoléculas.

5.3) Oxigênio molecular singlete como uma das espécies geradas na decomposição de hidroperóxidos

Com o intuito de avaliar a produção de $^1\text{O}_2$ gerado por hidroperóxidos de ácido linoleico utilizamos o DADB como sonda. Nos primeiros experimentos com o intuito de avaliar essa produção foram utilizados hidroperóxidos de LAOOH não marcados (dados não apresentados). Esses primeiros ensaios não foram bem sucedidos, uma vez que as pequenas quantidades de contaminantes de DADBO₂ geradas durante a sua síntese eram capazes de mascarar o efeito do $^1\text{O}_2$ gerado pelos LAOOH. Dessa maneira, para contornar esta desvantagem sintetizamos LAOOH isotopicamente marcados com átomos de oxigênio-18. Utilizando esta abordagem todo $^1\text{O}_2$ produzido nesse sistema seria marcado com oxigênio-18, desse modo todo [$^{18}(^1\text{O}_2)$] capturado pelo DADB geraria o produto de massa 411, resultante do acréscimo de 4 unidades de massa em relação ao produto da reação com o oxigênio não marcado. Consequentemente a contaminação pré-existente da massa 407 não mais interferiria no sistema.

Os primeiros ensaios utilizando LA¹⁸O¹⁸OH foram realizados em extrato celular. Nesse sistema fomos capazes de demonstrar que o LAOOH foi capaz de produzir $^1\text{O}_2$. Essa produção de $^1\text{O}_2$ foi dependente da presença de metal e da

concentração inicial de peróxidos no sistema. A realização dos experimentos em D₂O também foi capaz de aumentar a quantidade de DADBO₂ formada, consequentemente, reforçando que a transição 411/374 monitorada não seria nenhum produto não específico.

Nos ensaios realizados, três metais foram utilizados, Cu, Fe e Ce. Dos metais utilizados o mais eficiente foi o Ce, seguido do Cu e do Fe, esses resultados podem ser justificados com base no potencial de redução desses compostos, uma vez que o Ce⁴⁺ apresentando o maior potencial de redução ($E^0 \approx 1,5V$) sendo assim um potente oxidante (Dixon e Norman, 1964) capaz de gerar radicais peroxila com eficiência. Os potenciais de redução do Cu⁺ e do Fe²⁺ são de 0,31 e 0,11V, respectivamente, justificando a menor eficiência em relação ao Ce. Interessante notar que o potencial de redução do par LAOOH/LOO[•] é de 1,0V (Koppenol, 1990, 1994) desse modo não seria esperada a produção de radicais peroxila e sim a formação de radicais alcóxila, resultando na não formação de ¹O₂. No entanto, após a formação de radicais alcóxila dois eventos podem levar à geração desses radicais peroxila. O primeiro seria a reação direta do radical LAO[•] com os LAOOH, estes apresentando um potencial de redução de aproximadamente 1,3V (Koppenol, 1990, 1994), sendo assim termodinamicamente capaz de oxidar os LAOOH. No entanto, estudos mostraram que a velocidade de ciclização do radical alcóxila gerando um epóxido com um radical centrado no carbono supera em 10x as reações de abstração de hidrogênio (Venkataram *et al.*, 2004). Dessa maneira o radical epoxiperoxila poderia ser de fato a espécie geradora de ¹O₂ nos sistemas contendo Fe e Cu (Myiamoto *et al.*, 2003). Ambas as hipóteses justificariam a menor capacidade do Fe³⁺ comparado ao Fe²⁺ em gerar ¹O₂ no sistema metal-LAOOH.

A produção de $^1\text{O}_2$ em extratos celulares que tiveram a síntese de GSH inibida também foi estudada. Diferente da geração de $^1\text{O}_2$ pela fotossensibilização, a concentração de GSH parece influenciar a formação dessa espécie quando o sistema gerador é o LAOOH nos extratos celulares. A incubação dos LAOOH com os extratos levou a um consumo gradual desses, uma vez que foi diminuído esse consumo quando os extratos eram de células pré-tratadas com BSO ou quando os extratos eram tratados com MS.

Apesar de a utilização dos extratos celulares se aproximarem de uma situação fisiológica, a falta de compartimentalização celular é possivelmente a maior desvantagem desse tipo de modelo. Consequentemente, resultados obtidos nesse sistema não necessariamente refletem o que aconteceria em um modelo de células intactas.

Nos experimentos utilizando células intactas, as mesmas foram pré-incubadas com meio de cultura saturado com o captador ($\sim 100\mu\text{M}$ – para isso foram feitas 5 adições sequenciais durante um período de 3h aumentando a concentração em $20\mu\text{M}$ em cada adição). Após incubação, as células foram lavadas extensivamente (cinco vezes) para remover o DADB que não foi internalizado. Após essa etapa, as células foram tratadas com $100\mu\text{M}$ de LAOOH ou LAOOH/ Ce^{4+} , nos experimentos ficou evidenciada a formação das massas correspondentes ao DADBO_2 contendo dois, um ou nenhum átomo de oxigênio marcado. A formação de $\text{DADB}^{18}\text{O}_2$ apresentou níveis muito próximos do ruído, não possibilitando uma quantificação adequada. No entanto, a formação do DADBO_2 com apenas um átomo oxigênio marcado apresentou uma maior intensidade, que de acordo com Figura 5.1 mostraria que uma possível reação com outros radicais peroxila, não apresentando marcação isotópica seria favorecida. Esses dados exemplificam a complexidade do

sistema, uma vez que em ambientes contendo concentrações elevadas de oxigênio a transferência de energia entre o $^1\text{O}_2$ marcado gerado pela reação de dois radicais peroxila e o oxigênio não marcado presente no sistema poderiam levar à formação de $^1\text{O}_2$ não marcado (Miyamoto *et al.*, 2003) e consequente formação de endoperóxidos não marcados. Estes, se formados em baixa quantidade ficariam difíceis de diferenciar do residual existente que é formado na síntese do DADB. A utilização do endoperóxido do *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftalenodipropanamida (DHPNO₂) marcado em estudos que tiveram como objetivo a detecção de 8-oxodGuo marcada (Ravanat *et al.*, 2000) levou à geração exclusiva do produto marcado, levantando dúvidas sobre a relevância do processo de transferência de energia entre o $^1\text{O}_2$ para o oxigênio no estado fundamental. O estudo citado anteriormente utilizou concentrações extremamente altas do gerador (250mM), tal concentração poderia mascarar o efeito de transferência de energia que poderia ser observado quando concentrações menores são usadas. Por outro lado, diferente do DHPNO₂, LAOOH são moléculas consideravelmente mais apolares, sendo de fato possível que este $^1\text{O}_2$ estaria sendo gerado em ambientes mais apolares, onde a concentração de oxigênio é muito maior.

Figura 5.3: Esquema de captação ilustrando as diferentes vias que originam as massas geradas pela captação de diferentes isótopos do O_2 . (DADB - $R = C_5H_7O_2$)

5.4) Genotoxicidade induzida por LAOOH e efeito potenciador de fontes de ferro presentes na dieta

No presente trabalho foi investigada a influência de uma fonte dietética de ferro, a Hb, na citotoxicidade, indução de estresse oxidativo e genotoxicidade induzida por LAOOH em células de SW480. Sendo possível evidenciar que a Hb foi capaz de potencializar o efeito do LAOOH em todos os ensaios realizados.

No ensaio cometa a Hb sozinha apresentou genotoxicidade em concentrações superiores a 250µM. Esses dados estão de acordo com os trabalhos anteriores de Gleis *et al.*, (2002, 2006) que mostraram que a Hb pode induzir danos no DNA em células do cólon em concentrações que variam de 250-500 µM. A adição de Fpg demonstrou que concentrações mais baixas de Hb foram capazes de induzir modificações oxidativas nas bases do DNA.

Estudos que avaliaram o efeito da Hb, hemina e mioglobina em dano ao DNA induzido mostraram que estes compostos apresentaram genotoxicidade, e que se correlaciona com um aumento nas concentrações intracelulares de ferro /heme. Este ferro do heme por sua vez poderia ser degradado liberando o ferro livre que poderia catalisar a decomposição de peróxidos. No entanto a produção de oxidantes secundários não poderia ser negligenciada visto que a auto-oxidação da hemoglobina / heme poderia gerar $O_2^{\bullet-}$ (Mishra e Fridovich, 1972) que pode ser dismutado à peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, poderia reagir com o ferro/heme livre ou no interior das células levando à formação de espécies reativas o suficiente para danificar o DNA.

Com relação ao LAOOH sozinho, não foi observada genotoxicidade na versão padrão do ensaio cometa. No entanto, a utilização de Fpg possibilitou evidenciar um aumento no número de oxidações de purinas nas células tratadas com LAOOH. Este

efeito genotóxico do LAOOH é consistente com os achados de Kaneko et al. (2000) que estudou a formação de 8-oxodGuo em células pré-incubadas com Fe-NTA e expostos a LAOOH. Em nosso estudo, demonstramos que 8-oxodGuo é gerado em células pré-incubadas com Hb e expostos a LAOOH. A formação de 8-oxodGuo e o aumento de sítios Fpg sensíveis são de grande relevância, pois tais lesões podem levar ao mal pareamento do DNA, levando a formação de transversões do tipo GC / AT. Coincidentemente, esse tipo de transversão é a mais comumente encontrada em pacientes com câncer colorretal esporádico (Sjoblom *et al.*, 2006). Estudos recentes têm apontado que lesões ao DNA induzidas por processos oxidativos, medido como a formação de 8-oxodGuo, apresentam uma alta correlação com a diminuição da sobrevida de pacientes com câncer colorretal (Sheridan *et al.*, 2009).

O presente trabalho demonstra claramente que as células SW480, quando pré-tratadas com concentrações sub-tóxicas de Hb, são mais sensíveis a danos ao DNA induzidos por LAOOH. Isto poderia ser explicado por uma possível incorporação do grupo heme da Hb por células SW480. Altos níveis de heme / ferro podem acelerar a decomposição de LAOOH com a geração de radicais peroxil e alcóxil (Equação 5.1 e 5.2, respectivamente). Esses radicais são capazes de interagir com o DNA e resultar em modificações tais como a 8-oxodGuo (Figura 5.4, Rota I) (Lim *et al.*, 2004; Termini, 2000).

Espera-se que essas espécies devem ser geradas perto do DNA, a fim de interagir com o material genético. Uma vez que a relevância biológica destas reações

descritas para compostos modelo poderiam não ser fisiologicamente viáveis devido à compartimentalização do sistema celular. No entanto, é sabido que eventos que ocorreram em determinado espaço subcelular, podem levar à respostas em outros compartimentos. No estudo realizado por Ouedraogo et al. (2003), este mostrou que a fotossensibilização de membranas acarretou no aumento na peroxidação lipídica e quebras no DNA. Este efeito poderia ser diminuído com a aplicação de Trolox (antioxidante hidrofílico) e um quelante de metais, assim é assumido pelos autores que um precursor radicalar poderia estar induzindo os danos observados, uma vez que não é esperado que o trolox protegesse contra aldeídos gerados pela decomposição de LOOH. Além disso, durante o estresse oxidativo pode-se esperar que o tempo de vida do LAOOH possa ser aumentado, um possível mecanismo poderia envolver a proteína transportadora de esterol (SCP-2). Esta proteína foi capaz de inibir fortemente a redução por dois elétrons do LAOOH pelo sistema GSH/GPx1 (Girotti *et al.*, 2008), isso poderia levar a um aumento do tempo de vida do LOOH, favorecendo a sua acumulação intracelular e a sua presença nuclear. Apesar de não ser conclusivo, este estudo indica que os radicais peroxil e alcóxil poderiam estar envolvidos no efeito genotóxico do LAOOH. Como previamente descrito por nosso grupo, os radicais peroxil lipídicos são capazes de seguir outro caminho. Miyamoto et al., (2003a, 2005) mostraram que hidroperóxidos de ácido linoléico foram capazes de gerar $^1\text{O}_2$ *in vitro*. Nesse mecanismo, radicais peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) reagem por um mecanismo cíclico envolvendo um intermediário tetraóxido linear (ROOOOR) que se decompõe para gerar uma cetona (RO), um álcool (ROH) e oxigênio molecular no estado singlete. Assim, $^1\text{O}_2$ poderia reagir seletivamente com a guanina, levando à formação de 8-oxodGuo (Ravanat *et al.*, 2000, 2001, 2004) (Figura 5.4, Rota II).

Figura 5.4: Esquema de danos causados pelo sistema LAOOH/Hb. Figura modificado de Angeli et al., 2011.

Apoiando essa participação do possível papel do 1O_2 na genotoxicidade induzida por LAOOH, incubação de ferro e LAOOH com DNA plasmidial em tampão D₂O levou a um aumento na forma aberta circular do plasmídeo, na presença de FPG bem como na formação de 8-oxodGuo (Angeli et al., dados não publicados). No entanto novas investigações são necessárias, a fim de comprovar se essas espécies são de fato formada por LAOOH e pode levar a danos no DNA de células vivas. Além disso, os radicais formados na membrana celular são capazes de atacar os lípidios ou decompor a outros subprodutos, tais como aldeídos, cetonas e epóxidos.

Tais produtos de decomposição são muito reativos e podem reagir com o DNA formando lesões exocíclicas (Blair, 2001; Medeiros, 2009). Exposição das células a Hb e posterior adição de LAOOH gerou um aumento de 1-N²- ϵ dGuo. Esta lesão pode ser originada pela reação da dGuo com aldeídos α/β -insaturados (Cadet e Di Mascio, 2002). Apoiando essa hipótese, o trabalho de Kawai et al. (2007) mostrou que LAOOH na presença de metais pode se decompor em uma mistura complexa de aldeídos, como o MDA, DDE e HNE (Figura 5.4 – via A - Rota III). Tais reações podem também produzir produtos de decomposição menores, como a acroleína e crotonaldeído (Figura 5.4 - via B - Rota III). Algumas dessas lesões de DNA têm se mostrado altamente mutagênicas (Akasaka et al 1999; Fernandes *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009) e acreditam ter um papel importante na carcinogênese derivada por processos de peroxidação lipídica (tais como inflamação crônica) (Nair *et al.*, 2007).

Em todos os ensaios realizados, fomos capazes de mostrar que um período de pré-incubação com Hb aumentou a toxicidade do LAOOH e indicou um possível papel do aumento intracelular de ferro. Isto foi demonstrado através da avaliação de ferro total em lisados de células expostas à Hb. A absorção do heme é realizada por endocitose mediada por receptor ou por transporte direto (West e Oates., 2008). Uma vez absorvido, o Fe (II) é então liberado do heme pela ação de heme-oxigenases (Raffin *et al.*, 1974). A captação celular de ferro inorgânico é mediada por sistemas de transporte, que exigem a presença do íon ferroso Fe (II), que é muito instável e rapidamente se oxida a Fe (III) [8]. Para permitir a absorção, transportadores especializados são capazes de reduzir o Fe (III) para Fe (II) na superfície extracelular, permitindo assim a sua absorção (McKie *et al.*, 2001). A fim de minimizar a decomposição extracelular, diminuimos a presença de Hb

extracelular por extensas lavagem das células antes de adicionar LAOOH, isso foi confirmado pela medição do consumo de peróxido extracelular. Fomos capazes de mostrar que o consumo de peróxido extracelular foi a mesma para cada condição experimental, indicando que LAOOH está sendo consumido dentro da célula. Embora essa abordagem não fornece informações a respeito de eventos oxidativos a níveis subcelulares, certamente estimula mais estudos como os realizados por Kriska et al. (2006) com lípidios radioativos afim de medir a sua concentração nas frações subcelulares. A fim de melhor caracterizar este fenômeno, medimos também o conteúdo de peróxido intracelular nas frações polares e apolares após o tratamento com LAOOH. Estes experimentos foram capazes de mostrar que houve um aumento no teor de peróxido em ambos os compartimentos, no entanto o aumento da fração lipídica foi significativamente maior (Figura 5B de Apoio). Este aumento pode ser esperado uma vez que o ferro livre devido à sua carga positiva poderia ser atraído pela carga negativa de fosfolípidios (o mesmo poderia ser expandido para o núcleo), facilitando assim a peroxidação lipídica (Carlsen *et al.*, 2005). Além disso, a presença de hidroperóxidos na fração solúvel pode de fato indicar que esta espécie poderia estar translocando-se e levando à uma possível decomposição perto do núcleo. No entanto, não podemos excluir que os peróxidos presentes na fração solúvel poderiam ser originados a partir de uma reação em cadeia levando à geração de outros peróxidos. Peróxidos, como os de proteínas, apresentam meia vida elevada (Wright *et al.*, 2002) e também capaz de induzir danos ao DNA (Furukawa *et al.*, 2005; Luxford *et al.*, 2002). Para enfatizar a relevância do ferro na indução da oxidação do DNA utilizamos a versão modificada do ensaio cometa. Neste conjunto de experimentos, nós fomos capazes de mostrar uma correlação positiva entre o teor de ferro e fragmentação de DNA promovido

pela LAOOH, que indicaram mais uma vez o importante papel desempenhado pela heme / ferro na genotoxicidade LAOOH. É importante notar que não foi possível diferenciar se o ferro encontrado intracelularmente estava na forma livre, quelado a outras biomoléculas ou se era ligado ao grupo heme. De maneira intrigante, incubação com Hb por períodos prolongados resultaram em um efeito protetor. Esse efeito protetor poderia ser explicado pela decomposição possível do grupo heme por oxigenases heme para produzir CO e bilirrubina. A bilirrubina já foi relatada como um potente antioxidante lipofílico, portanto, é concebível que a exposição a períodos mais longos para Hb podem ter níveis de bilirrubina aumentados e como consequência as células apresentaram uma maior proteção contra a peroxidação lipídica induzida por LAOOH (MacLean *et al.*, 2007). Com base nestes resultados, propomos que altos níveis de heme/ferro leva a um aumento da genotoxicidade induzida pelo LAOOH, que pode ser devido à decomposição de LAOOH por heme / ferro para gerar peroxil, alcoxil radicais, $^1\text{O}_2$ e aldeídos que podem interagir com DNA, gerando lesões pró-mutagênicas.

6) Conclusões

Com o presente trabalho desenvolvemos uma metodologia para detecção de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos. Nossa metodologia empregou um derivado de antraceno que apresenta especificidade, baixa toxicidade celular e foi capaz de se acumular no interior das células. A detecção do composto foi feita por uma nova metodologia utilizando HPLC-MS/MS, que resultou em uma alta sensibilidade capaz de detectar baixas concentrações do produto específico da reação entre o $^1\text{O}_2$ e a probe.

Também investigamos os efeitos da produção de $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares utilizando o fotossensibilizador RB que gerou $^1\text{O}_2$ intracelularmente através da metodologia descrita por nós. A produção de $^1\text{O}_2$ foi seguida de um acúmulo de peróxidos intracelulares, e consequente morte celular. Este dado foi corroborado por experimentos onde se demonstrou que sistemas capazes de interferir na formação ou detoxificação dos peróxidos intracelulares levaram a um aumento significativo na morte celular induzida por fotossensibilização.

A capacidade de LAOOH em atuar como moléculas pró-oxidantes que podem gerar $^1\text{O}_2$ via mecanismo de Russell foi estudada em sistemas complexos como extratos celulares e células em cultura. Para tal, utilizamos LAOOH marcado isotopicamente de forma a evitarmos possíveis problemas metodológicos. Através da metodologia baseada no uso do DADB acoplado a HPLC-MS/MS descrita anteriormente foi possível demonstrar claramente que LAOOH é capaz de gerar $^1\text{O}_2$ em células em cultura, tal fato aparenta ter relevância nos processos tóxicos desencadeados pelo $^1\text{O}_2$.

Completamos o trabalho estudando a genotoxicidade dos LAOOHs, onde, foi demonstrado, *in vitro*, que o $^1\text{O}_2$ está de fato envolvido nos danos ao DNA induzidos

por LAOOH. Utilizando células em cultura não foi possível caracterizar de maneira definitiva qual a espécie envolvida no processo tóxico.

No entanto, nossos resultados demonstraram um aumento nos níveis de lesões exocíclicas, indicando que em sistemas mais complexos a decomposição dos LAOOHs origina aldeídos capazes de reagir com o DNA. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a interação da Hb e LAOOH nas concentrações encontradas na dieta humana podem apresentar efeito sinérgico na indução de danos no DNA em células SW480. Esses dados apontam para o aumento da probabilidade de eventos danificarem o DNA em populações que consomem altos níveis de gordura e carne vermelha. Tais eventos genotóxicos podem participar nos estágios iniciais de desenvolvimento de câncer devido ao aumento nas alterações do DNA.

7) Perspectivas

Os LOOHs têm surgido como importantes médiadores em diversas patologias devido a sua capacidade de gerarem oxidantes secundários e produtos de decomposição capazes de modificarem diversas biomoléculas como proteínas e DNA. Diversos estudos têm demonstrado que estas espécies são capazes de desencadear eventos em sítios distantes dos seus locais de geração. Neste sentido o presente trabalho abre novas perspectivas no sentido de apresentar dados mostrando o efeito toxico destes compostos bem como sua capacidade de gerar moléculas secundarias capazes de induzirem danos em biomoléculas. Além disso, a capacidade destes compostos de desencadear respostas celulares distantes dos seus sítios de geração estimula novos estudos no sentido de compreender possíveis alvos bem como as consequências biológicas destas modificações. Tal desafio pode ser alcançado através da utilização de técnicas analíticas robustas como a espectrometria de massas e o uso de hidroperóxidos marcados isotopicamente. A identificação das modificações bem como seu mecanismo de formação aliado a técnicas de biologia celular e molecular pode nos ajudar a compreender o papel fisiológico dos hidroperóxidos em sistemas complexos.

8) Referências bibliográficas

Angeli, J.P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. Evaluation of oxidative DNA damage in aquatic animals: comet assays and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) levels. In: **Oxidative stress in aquatic ecosystems**. Ed, Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. Wiley-Blackwell, 2011.

Azqueta, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutat. Res.** 674:101-108.

Agon, V.V., Bubb, W.A., Wright, A., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2006) Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. **Free Radic. Biol. Med.** 40: 698-710.

Akasaka, S., Guengerich, F.P. (1999). Mutagenicity of site- specifically located 1,N 2-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. **Chem. Res. Toxicol.** 12: 501–507.

Aubry, J. M., Rigaudy, J., Cuong, N.K. (1981). A water-soluble rubrene derivate: synthesis, properties and trapping of $^1\text{O}_2$ in aqueous solution. **Photochem. Photobiol.** 33: 149.

Augusto, O. (2006). Radicais Livres: bons, maus e naturais, Vol. 1, Oficina dos textos, São Paulo.

Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., De Menezes, S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. **Free Rad. Biol. Med**, 32: 841-859.

Avissar, N., Ornt, D.B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R.H., Kerl, E.A., Takahashi, K., Palmer, I. S., Cohen, H. J. (1994). Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. **Am. J. Physiol.** 266: 367-375.

Belikova, N. A., Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Potapovich, M. V., Basova, L. V., Peterson, J., Kurnikov, I. V., Kagan, V. E. (2006). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. **Biochemistry**. 45, 4998-5009.

Belikova, N. A., Tyurina, Y. Y., Borisenko, G., Tyurin, V., Samhan Arias, A. K., Yanamala, N., Furtmuller, P. G., Klein-Seetharaman, J., Obinger, C., Kagan, V. E. (2009). Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria. **J. Am. Chem. Soc.** 131, 11288-11289.

Blair, I.A. (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. **Exp. Gerontol.** 19: 280-291.

Blair, I. A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. **J. Biol. Chem.** 283: 15545-15549.

Bradford, M.M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **J. Biol. Chem.** 274: 23679-23682.

Brinkhorst, J., Nara, S.J., Pratt, D.A. (2008). Hock Cleavage of Cholesterol 5 α -Hydroperoxide: An Ozone-Free Pathway to the Cholesterol Ozonolysis Products Identified in Arterial Plaque and Brain Tissue. **J. Am. Chem. Soc.** 130: 12224-12225.

Buchko, G.W., Cadet, J., Berger, M., Ravanat, J.L. (1992). Photooxidation of d(TpG) by phthalocyanines and riboflavin. Isolation and characterization of dinucleoside monophosphates containing the 4R* and 4S* diastereoisomers of 4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-deoxyguanosine. **Nucleic. Acids. Res.** 20: 4847-4851.

Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.** 300: 535-543.

Cadenas, E., Sies, H. (1984). Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. **Methods Enzymol.** 105: 221-231.

Cadet, J.; Di Mascio, P. (2002). Peroxydes in biological systems. In: Rappoport, Z., ed. The chemistry of peroxides, vol 2. John Wiley&sons: 915-999.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. (2008). Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Acc. Chem. Res.** 41: 1075-1083.

Cantrell, A., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., Rancan, F., Bohm, F. (2003). Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment, **Arch. Biochem. Biophys.** 412: 47–54.

Carlsen, C.U., Moller, J.K.S., Skibsted, L.H. (2005). Heme-iron in lipid oxidation. **Coord. Chem. Rev.** 249: 485-498.

Carvalho, V. M., Asahara, F., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I. P., Cadet, J., Medeiros, M. H. (2000). Novel 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. **Chem. Res. Toxicol.** 13: 397-405.

Carvalho, V. M., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I. P., Douki, T., Cadet, J., Medeiros, M. H. (1998). Formation of 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by trans,trans-2, 4-Decadienal. **Chem. Res. Toxicol.** 11: 1042-1047

Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., Radi, R. (2000). Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **J. Biol. Chem.** 275: 21409-21415.

Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., Jr., and Lei, X. G. (1998). Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. **J Nutr**, 128: 1070-1076.

Chignell, C.F., Motten, A.G., Buettner, G.R. (1985). Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization. **Environ Health Perspect**, 64: 103–110.

Conner, E.M., Grisham, M.B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants, **Nutrition** 12: 274–277.

Conrad, M., Moreno, S. G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G. W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. **Mol. Cell. Biol.** 25: 7637-7644.

Conrad, M., Sandin, A., Förster, H., Seiler, A., Frijhoff, J., Dagnell, M., Bornkamm, G.W., Rådmark, O., Hooft van Huijsduijnen, R., Aspenström, P., Böhmer, F., Ostman, A. (2010). 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107: 15774-15779.

Conrad, M. (2009). Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. **Biochim. Biophys. Acta.** 1790: 1575-85.

Crescimanno, M., Armata, M.G., Rausa, L., Gueli, M.C., Nicotra, C., D'Alessandro, N. (1989). Cardiac peroxisomal enzymes and starvation. **Free Radic Res Commun.** 7: 67-72.

Cheng, W., Fu, Y.X., Porres, J.M., Ross, D.A., Lei, X.G. (1999). Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. **FASEB. J.** 11: 1467-1475

Christoph, H., Parlow, F., Budnik, A., Block, R., Schöpf, E., Krutmann, J. (1993). Ultraviolet A1 radiation-induced immunomodulation: UVA1- and UVB-radiation both affect human keratinocyte expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), although by different mechanisms. **Abstract. Arch Dermatol Res** 285: 56.

Davies, M.J. (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. **Photochem. Photobiol. Sci.** 3: 17-25.

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W. (2002) Antioxidants in photosynthesis and human nutrition, **Science.** 298: 2149–2153.

Devasagayam, T.P., Sundquist, A.R., Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1991). Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. **J. Photochem. Photobiol. B.** 9: 105-16.

Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274: 532-538.

Di Mascio, P., Devasagayam, T.P., Kaiser, S., Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Transact.** 18: 1054-1056.

Di Mascio, P., Menck, C.F., Nigro, R.G., Sarasin, A., Sies H. (1990). Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector. **Photochem. Photobiol.** 51: 293-298

Dixon, W.T., Norman, R.O.C. (1964). Electron spin resonance studies of oxidation. Part IV. Some benzenoid compounds. **J. Chem. Soc.** 4857-4860.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, and Peng Q. (1998). Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst** 90: 889–905.

Dringen, R.; Hamprecht, B. (1997) .Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. **Brain Res.** 759: 67–75.

Ehrenshaft, M., Silva, S.O., Perdivara, I., Bilski, P., Sik, R.H., Chignell, C.F., Tomer, K.B., Mason, R.P. (2009). Immunological detection of N-formylkynurenine in oxidized proteins. **Free Radic. Biol. Med.** 2009 May 1;46(9):1260-6.

Ehrenshaft, M., Bonini, M.G., Feng, L., Chignell, C.F., Mason, R.P. (2010). Partial colocalization of oxidized, N-formylkynurenine-containing proteins in mitochondria and Golgi of keratinocytes. **Photochem. Photobiol.** 86: 752-756.

Ek-Von Mentzer, B.A., Zhang, F., Hamilton. J.A. (2001). Binding of 13-HODE and 15-HETE to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins. implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.** 276:15575-15580.

Esterbauer, H., Lang, J., Zdravec, S., Slater, T. F. (1984). Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymol.** 105: 319-328.

Esworthy, R. S., Mann, J. R., Sam, M., and Chu, F. F, (2000). Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma irradiation damage. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 279: 426-436.

Farmilo, A., Wilkinson, F. (1973). On the mechanism of quenching of singlet oxygen in solution. **Photochem. Photobiol.** 18: 447-450.

Ferrer-Sueta, G., Radi, R. (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **ACS Chem. Biol.** 4: 161-177.

Fernandes, P.H., Kanuri, M., Nechev, L.V., Harris, T.M., Lloyd, R.S. (2005). Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. **Environ. Mol. Mutagen.** 45: 455–459.

Frimer, A. A., Stephenson, L.M. (1985). Reaction modes and products. Singlet O₂. A.A. Frimer, CRC Press Inc, Il:67-91.

Falomir Lockhart, L.J., Burgardt, N.I., Ferreyra, R.G., Ceolin, M., Ermácora, M.R., Córscico, B. (2009). Fatty acid transfer from *Yarrowia lipolytica* sterol carrier protein 2 to phospholipid membranes. **Biophys. J.** 97: 248-256.

Ferguson, L.R. (2010). Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutat. Res.** 690: 3-11.

Fiala, E. S., Conaway, C. C., Mathis, J. E. (1989). Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. **Cancer Res.** 49: 5518-5522.

Flohe, L., Gunzler, W. A., Schock, H. H. (1973). Glutathione Peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS. Lett.** 32: 132-134.

Foote, C.S. (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. **Science**, 162: 963–970.

Fu, Y., Cheng, W. H., Porres, J. M., Ross, D. A., Lei, X. G. (1999). Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative strêss. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 605-6011.

Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M.J., Kawanishi, S. (2005). Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. **Biochem. J.** 388: 813-818.

Garcia, C.C.M., Freitas, F.P., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G. (2010). Ultra-sensitive simultaneous quantification of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine in DNA by on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. **Chem. Res. Toxicol.** 23: 1245-1255.

Garcia, C.C.M., Angeli, J.P.F., Freitas, F.P., Gomes, O.F., Oliveira, T.F., Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G. (2011). [$^{13}\text{C}_2$]- Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N₂-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. **J. Am. Chem. Soc.** *In press*.

Garcia, C.C.M. (2010). Quantificação de danos em DNA induzidos por acetaldeído. Potencial biomarcador de poluição ambiental. **Tese de doutorado**, IQ-USP.

Gay, C., Collins, J., Gebicki, J.M. (1999). Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex, **Anal. Biochem.** **273**: 149–155.

Gay, C.A., Gebicki, J.M. (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. **Anal. Biochem.** **315**: 29-35.

Girotti, A.W., Korytowski, W, (2002). Cholesterol as a singlet oxygen detector in biological systems. **Methods Enzymol.** **319**: 85-100.

Girotti, A.W., Kriska, T., (2004). Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative strêss signalling. **Antioxid. Redox. Signal.** **6**: 301-310.

Girotti, A.W. (2008). Translocations as means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. **Free Radic. Biol. Med.** 44: 956-968.

Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., van Nieuwenhoven, F.A., van de Vusse, G.J., 1997. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocations of fatty acids. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.** 57: 3-9.

Glei, M.; Latunde-Dada, G.O.; Klinder, A.T.; Becker, W.; Hermann, U.; Voigt, K.; Pool-Zobel, B.L. (2002). Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. **Mutat. Res.** 519: 151-161.

Glei, M.; Klenow, S.; Sauer, J.; Wegewitz, U.; Richter, K.; Pool-Zobel, B.L. (2006). Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. **Mutat. Res.** 594: 162-171.

Grether-Beck, S., Oliazola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J.P., Briviba, K., Sies, H., Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates ultraviolet A radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule-1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93:14586–14591.

Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J.P., Piette, J., Krutmann, J. Nonenzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. **EMBO. J.** 19: 5793–5800.

Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 922–935.

Gupta, M., Dobashi, K., Greene, E.L., Orak, J.K., Singh, I. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. **Mol. Cell. Biochem.** 176: 337–347.

Hall, A., Karplus, P.A., Poole, L.B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. **FEBS. J.** 276: 2469-2477.

Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. New York, USA: **Oxford Science Publications.**

Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. New York, USA: **Oxford University Press.**

Hamberg, M., Samuelsson, B. (1967). On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. **J. Biol. Chem.** 242: 5336-5343.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood.** 92: 3007-3017.

He, Y.Y., Council, S.E., Feng, L., Bonini, M.G., Chignell, C.F. (2008). Spatial distribution of protein damage by singlet oxygen in keratinocytes. **Photochem. Photobiol.** 84: 69-74.

Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D. (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272:16644-16651

Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxid. Redox. Signal.** 4: 811-820.

Howard, J. A., Ingold, K.U. (1968). Self reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. **J. Am. Chem. Soc.** 90: 1056-1058.

ImLay, J. A. (2008). Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. **Annu. Rev. Biochem**, 77: 755-776.

Jaburek, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Garlid, K.D., Jezek, P. (2004). Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP-2. *J. Biol. Chem.* 279: 53097-53102.

Kagan, V. E.; Gleiss, B.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Elenstrom-Magnusson, C.; Liu, S. X.; Serinkan, F. B.; Arroyo, A.; Chandra, J.; Ohnrius, S.; Fadeel, B. (2002). A

role for oxidative strêss in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. **J. Immunol.** 169: 487–499.

Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I.V., Borisenko, G.G. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. **Nat. Chem. Biol.** 14: 223-232.

Kamp, F., Hamilton, J.A. (2006). How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. **Prostaglandins Leukot. Essent . Fatty Acids.** 75: 149-159.

Kaneko, T., Tahara, S. (2000). Formation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in the DNA of human diploid fibroblasts by treatment with linoleic acid hydroperoxide and ferric ion. **Lipids**, 35: 961-965.

Kanofsky, J.R., Axelrod, B. (1986). Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. **J. Biol. Chem.** 261:1099-1104.

Kawai, Y., Takeda, S., Terao, J. (2007). Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. **Chem. Res. Toxicol.** 20: 99-107

Khan, A.U., Kasha, M. (1963). Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. **J. Chem. Phys.** 39: 2105-2108.

Klotz, L.O., Briviba, K., Sies, H. (1997). Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. **FEBS. Lett.** 408: 289-291.

Klotz, L.O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J.M., Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. **Eur. J. Biochem.** 260: 917-922.

Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Sies, H. (2003). Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. **Photochem. Photobiol. Sci.** 2: 88-94.

Kochevar, I.E. (2004). Singlet oxygen signaling: from intimate to global. **Sci. STKE.** 221: 1-3.

Koppenol, W. H. (1990). Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS. Lett.** 264: 165-168.

Koppenol, W. H. (1994). Thermodynamic considerations on the formation of reactive species from hypochlorite, superoxide and nitrogen monoxide. Could

nitrosyl chloride be produced by neutrophils and macrophages? **FEBS. Lett.** 347: 5-8.

Kreitner, M., Ebermann, R., Alth, G. (1996). Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins. **J. Photochem. Photobiol. B.** 23: 109.

Kriska, T.; Levchenko, V.V.; Korytowski, W.; Atshaves, B.P.; Schroeder, F.; Girotti, A.W. (2006). Intracellular dissemination of peroxidative strêss. Internalization, transport, and lethal targeting of a cholesterol hydroperoxide species by sterol carrier protein-2-overexpressing hepatoma cells. **J. Biol. Chem.** 281: 23643-23651.

Krutmann, J., Grewe, M. (1995). Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. **J. Invest. Dermatol.** 105: 67–70.

Krutmann, J. (2000). Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. **J Dermatol Sci.** 23: 22-26.

Kühn, H., Wiesner, R., Lankin, V.Z., Nekrasov, A., Alder, L., Schewe, T. (1987). Analysis of the stereochemistry of lipoxygenase-derived hydroxypolyenoic fatty acids by means of chiral phase high-pressure liquid chromatography. **Anal. Biochem.** 160: 24-34.

Lancaster, J. R. Jr. (1997). A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**, 1: 18-30.

Langlois, R., Ali, H., Brasseur, N., Wagner, J.R., van Lier, J.E. (1986). Biological activities of phythalocyanines – IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines, **Photochem. Photobiol.** 44: 117–123.

Li, M.Y., Cline, C.S., Koker, E.B., Carmichael, H.H., Chignell, C.F., Bilski, P. (2001). Quenching of Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$) by Azide Anion in Solvent Mixtures. **Photochem. Photobiol.** 74: 760-764.

Li, C.Y., Jackson R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury, **Am. J. Physiol.-Cell Physiol.** 282: 227–241.

Lim, P., Wuenschell, G.E., Holland, V., Lee, D.H., Pfeifer, G.P., Rodriguez, H., Termini, J. (2004). Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. **Biochemistry**. 43: 15339-15348.

Lindig, B. A., Rodgers, M. A. J., Schaap, A. P. (1980). Determination Of The Lifetime Of Singlet Oxygen In D_2O Using 9,10-Anthracenedipropionic Acid, A Water-Soluble Probe. **J. Am. Chem. Soc.** 102: 5590-5593.

Loureiro, A.P., Di Mascio, P., Gomes, O.F., Medeiros, M.H. (2000). Trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. **Chem. Res. Toxicol.** 13: 601-609.

Luxford, C., Dean, R.T., Davies, M.J. (2002). Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. **Biogerontology.** 3: 95-102.

MacLean, P.D., Drake, E.C., Ross, L., Barclay, C. (2007). Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. **Free Radic. Biol. Med.** 43: 600-609.

Marnett, L.J., Plataras, J.P. (2001). Endogenous DNA damage and mutation. **Trends Genet.** 17: 214-221.

Marnett, L.J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. **Tóxicology.** 181-182: 219-222.

Martinez, G.R., Garcia, F., Catalani, L.H., Cadet, J., Oliveira, M.C.B., Ronsein, G.E., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Mascio, P. D. (2006). Synthesis of a hydrophilic and non-ionic anthracene derivative, the N,N'-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a chemical trap. **Tetrahedron.** 62: 10762-10770

McCall, D. B. (1984). Sodium 9,10-Bis(2-Ethylene)Anthracene Disulfate: a new water-soluble singlet oxygen trap for biological systems and polymer-immobilized naphthalene endoperoxides: a new convenient singlet oxygen generator. – **Tese de doutorado**, Wayne State University.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 244: 6049–6055.

McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bromford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science.** 291: 1755–1759.

Medeiros, M.H.G. (2009). Exocyclic DNA Adducts as Biomarkers of Lipid Oxidation and Predictors of Disease. Challenges in Developing Sensitive and Specific Methods for Clinical Studies. **Chem. Res. Toxicol.** 22: 419-425.

Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J. Biol. Chem.** 269: 9397-9400.

Meister, A., Anderson, M. E. (1983). Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 711-760.

Mendenhall, G.D., Sheng, X.C., Wilson, T. (1991). Yields of excited carbonyl species from alcoxyl and from alkylperoxyl radical dismutations. **J. Am. Chem. Soc.** 113: 8976-8977.

Michaeli, A., Feitelson, J. (1994). Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. **Photochem. Photobiol.** 59: 284-289.

Minami, Y., Yokoyama, K., Bando, N., Kawai, Y., Terão, J. (2008). Occurrence of singlet oxygen oxygenation of oleic acid and linoleic acid in the skin of live mice. **Free Radic Res.** 42:197-204

Minami, Y., Kawabata, K., Kubo, Y., Arase, S., Hirasaka, K., Nikawa, T., Bando, N., Kawai, Y., Terao, J. (2008). Peroxidized cholesterol-induced matrix metalloproteinase-9 activation and its suppression by dietary beta-carotene in photoaging of hairless mouse skin. **J. Nutr. Biochem.** 20: 389-398.

Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 247: 6960-6962.

Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2003a). Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **J. Am. Chem. Soc.** 125: 6172-6179.

Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2003b). Direct evidence of singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxyxynitrite. **J. Am. Chem. Soc.** 125: 4510-4517

Miyamoto, S. (2005). Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio singlete: estudos com marcação isotópica, espectometria de massa e luminescencia. **Tese de doutorado**, IQ-USP.

Miyamoto, S., Martinez, G.R., Rettori, D., Augusto, O., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2006). Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 293-298.

Miyamoto, S., Nantes, I.L., Faria, P.A., Yamaguti, T.H., Bataglioli, D.C., Derogis, P.B.M.C., Appolinario, P.P., Motta, F.D., Ronsein, G.E., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. (2011). Cytochrome c-cardiolipin complex as a source of singlet molecular oxygen in mitochondria. **Biochem. J.** in press.

Mulliez, E., Leblanc, J.P., Girerd, J.J., Rigaud, M., Chottard, J.C. (1987). 5-Lipoxygenase from potato-tubers – improved purification and physiological characteristics. **Biochim. Biophys. Acta.** 916: 13-23.

Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P.T., Winterbourn, C.C. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell. Metab.** 13: 361-366.

Nagano, T. (2009). Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. **J. Clin. Biochem. Nutr.** 45: 111-124.

Nair, U., Bartsch, H., Nair, J. (2007). Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free Radic. Biol. Med.** 43: 1109–1120.

Nardello, V., Aubry, J.M., Johnston, P., Bulduk, I. de Vries A.H.M., Alsters, P.L. (2005). Facile preparation of the water-soluble singlet oxygen traps anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS) and anthracene-9,10-diethylsulfonate (AES) via a heck reaction with vinylsulfonate, **Synlett.** 17: 2667-2669.

Netto, L.E., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P., Cussiol, J.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., Horta, B.B. (2007). Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comp. Biochem. Physiol. C. Tóxicol. Pharmacol.** 146: 180-193.

Ogilby, P.R. (2010). Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. **Chem. Soc. Rev.** 39: 3181-3209

de Oliveira, R.C., Ribeiro, D.T., Nigro, R.G., Di Mascio, P., Menck, C.F. (1992) Singlet oxygen induced mutation spectrum in mammalian cells. **Nucleic. Acids Res.** 20: 4319-4323.

Oliveira, C.S., Turchiello, R., Kowaltowski, A.J., Indig, G.L., Baptista, M.S. (2011). Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radic. Biol. Med.** In press.

Oliveira, M.S., Sevrino, D., Prado, F.M., Angeli, J.P., Motta, F.D., Baptista, M.S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. (2011). Singlet molecular oxygen trapping by the fluorescent probe diethyl-3,3'-(9,10- anthracenediyl)bisacrylate synthesized by the Heck reaction. **Photochem. Photobiol. Sci**, *in press*.

Olson, G.E., Whitin, J.C., Hill, K.E., Winfrey, V.P., Motley, A.K., Austin, L.M., Deal, J., Cohen, H.J., Burk, R.F. (2010). Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 298: 1244–1253.

Olson, J.A., Krinsky, N.I., (1995). Introduction: the colorful fascinating world of the carotenoids: important physiologicmodulators, **FASEB. J.** 9: 1547–1550.

Ouédraogo, G.D., Redmond, R.W. (2003). Secondary reactive oxygen species extend the range of photosensitization effects in cells: DNA damage produced via initial membrane photosensitization. **Photochem. Photobiol.** 77: 192-203.

Palmer, C.D.; Lewis M.E.; Geraghty, C.M.; Barbosa, F.; Parsons, P.J. (2006). Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.** 61: 980-990.

Park, J.W., Floyd, R.A. (1992). Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. **Free Radic. Biol. Med.** 12: 245-250.

Parsonage, D., Karplus, P.A., Poole, L.B. (2008). Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105: 8209–8214.

Peskin, A.V., Cox, A.G., Nagy, P., Morgan, P.E., Hampton, M.B., Davies, M.J., Winterbourn, C.C. (2010). Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **Biochem. J.** 432: 313-21.

Pierlot, C., Hajjam, S., Barthélémy, C., Aubry, J. M. (1996). Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$, $^1\ddot{\text{A}}_g$) carriers for biological media, **J. Photochem. Photobiol. B.** 36: 31-39.

Prado, F.M., Oliveira, M.C., Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Ronsein, G.E., Di Mascio, P. (2009). Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. **Free. Radic. Biol. Med.** 47: 401-409.

Prat, F., Hou, C.C., Foote, C.S. (1997). Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in nonaqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.** 119: 5051-5052.

Raffin, S.B., Woo, C.H., Roost, K.T., Price, D.C., Schmid, R. (1974). Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. **J. Clin. Invest.** 54: 1344–1352.

Ravanat, J.L.; Di Mascio, P.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Cadet, J. (2000). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **J. Biol. Chem.** 275: 40601-40604.

Ravanat, J.L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P. Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G. Cadet, J. (2001). Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. **Helvetica Chimica Acta.** 84: 3702-3709.

Ravanat, J.L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Di Mascio, P., Cadet, J. (2004). Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Arch. Biochem. Biophys.** 423: 23-30

Ravanat, J.L., Sauvaigo, S., Caillat, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Favier, A., Cadet, J. (2004). Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. **Biol. Chem.** 385: 17-20.

Redmond, R.W., Kochevar, I.E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. **Photochem Photobiol.** 82:1178-1186.

Ribeiro, D.T., Madzak, C., Sarasin, A., Di Mascio, P., Sies, H., Menck, C.F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage and mutagenicity in a single-stranded SV40-based shuttle vector. **Photochem. Photobiol.** 55: 39-45.

Rodgers, M.A.J., Snowden, P.T. (1982). Lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ In Liquid Water As Determined By Time-Resolved Infrared Luminescence Measurements. **J. Am. Chem. Soc.** 104: 5541-5543.

Ronsein, G.E., Miyamoto, S., Bechara, E.J.H., Di Mascio, P., Martinez, G.R. (2006). Singlet oxygen mediated protein oxidation: damage mechanism, detection techniques and biological implications. **Quim. Nova.** 29: 563-568.

Ronsein, G.E., Oliveira, M.C., Miyamoto, S., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2008) Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [$O_2(1\Delta g)$]: mechanistic studies using ^{18}O -labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. **Chem. Res. Tóxicol.** 21:1271-83.

Ronsein, G.E. (2008). Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no estado singlete: estudos mecanísticos envolvendo marcação isotópica, espectrometria de massa e quimiluminescência. **Tese de doutorado.** IQ-USP.

Ronsein, G.E., Martinez, G.R., Almeida, E. A., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. Role of singlet molecular oxygen in the oxidative damage to biomolecules. In: **Oxidative stress in aquatic ecosystems.** Ed, Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. Wiley-Blackwell, 2011.

Roots, R., Okada, S. (1975). Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. **Radiat. Res.** 64: 306–320.

Ross, W.C. (1950). Biological action of x-rays, nitrogen mustards, diepoxides and peroxides. **Nature**, 165:808-809.

Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**. 179: 588-590.

Russell, G. A. (1957). Deuterium-Isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. **J. Am. Chem. Soc.** 79: 3871-3877.

Saito, I., Matsuura, T., Nakagawa, M., Hino, T. (1977). Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives. **Acc. Chem. Res.** 10: 346-352.

Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **J. Biol. Chem.** 274: 11455-11458.

Schneider, C. (2009). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. **Mol. Nutr. Food Res.** 53: 315-321.

Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Schweizer, U., Conrad, M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. **Cell Metab.** 8: 237-248.

Sheridan, J.L., Wang, M., Tosetto, M., Sheahan, K., Hyland, J., Fennelly, D., O'Donoghue, D., Mulcahy, H., O'Sullivan, J. (2009). Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer. **Br. J. Cancer.** 100: 381-388.

Shi, Z. Z., Osei-Frimpong, J., Kala, G., Kala, S. V., Barrios, R. J., Habib, G. M., Lukin, D. J., Danney, C. M., Matzuk, M. M., and Lieberman, M. W. (2000). Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 97: 5101-5106.

Sies, H., Krinsky, N. I. (1995). The Present Status of Antioxidant Vitamins and Beta-Carotene. **Am. J. Clin. Nutr.** 62: 1299-1300.

Sies, H., de Groot, H. (1992). Role of reactive oxygen species in cell toxicity. **Toxicol. Lett.** 65: 547-51.

Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. **Science.** 314:v268-274.

Steenken, S., Jovanovic, S.V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.** 119: 617-618.

Steinbeck, M.J., Khan, A.U., Karnovsky, M.J. (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J. Biol. Chem.**, 267: 13425-13433.

Steinbeck, M.J., Khan, A.U., Karnovsky, M.J. (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **J. Biol. Chem.** 268: 15649-15655.

Tanaka, K., Miura, T., Umezawa, N., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T. (2001). Rational design of fluorescein based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. **J. Am. Chem. Soc.** 123: 2530–2536.

Terao, J., Shibata, S.S., Matsushita, S. (1988). Selective quantification of arachdonic acid hydroperoxides and their hydroxy derivatives in reverse-phase high performance liquid-chromatography. **Anal. Biochem**, 169: 415-423.

Termini, J. (2000). Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. **Mutat. Res.** 450: 107-124.

Tomita, M., Irie, M., Ukita, T. (1969). Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. **Biochemistry**. 8: 5149-5156.

Tyrrell, R.M. (2000). Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. **Methods Enzymol**. 319: 290-295.

Tyurina, Y. Y.; Kawai, K.; Tyurin, V. A.; Liu, S. X.; Kagan, V. E.; Fabisiak, J. P. (2004). The plasma membrane is the site of selective phosphatidylserine oxidation during apoptosis: role of cytochrome c. **Antioxid. Redox Signal**. 6: 209–225.

Uemi, M., Ronsein, G.E., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. (2009). Generation of cholesterol carboxyaldehyde by the reaction of singlet molecular oxygen [$O_2 ({}^1\Delta_g)$] as well as ozone with cholesterol. **Chem. Res. Tóxicol**. 22: 875-884.

Umezawa, N., Tanaka, K., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., and Nagano, T. (1999). Novel fluorescent probes for singlet oxygen. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**. 38: 2899–2901.

Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. **Biochim. Biophys. Acta**. 710: 197-211.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, **Mol. Cell. Biochem.** 266: 37–56.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** 160:1-40.

Venkataraman, S., Schafer, F.Q., Buettner, G.R. (2004). Detection of lipid radicals using EPR. **Antioxid. Redox. Signal.** 6: 631-638.

Vila, A., Korytowski, W., Girotti, A.W. (2000). Dissemination of peroxidative strêss via intermembrane transfer of lipid hydroperoxides: model studies with cholesterol hydroperoxides. **Arch. Biochem. Biophys.** 380: 208-218.

Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free Radic. Biol. Med.** 43: 995-1022.

Wang, H., Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative strêss by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 612-616.

Wentworth, P., Jr., Nieva, J., Takeuchi, C., Galve, R., Wentworth, A.D., Dilley, R.B., DeLaria, G.A., Saven, A., Babior, B.M., Janda, K.D., Eschenmoser, A., Lerner, R.A. (2003). Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. **Science**. 302: 1053-1056.

West, A.R., Oates, P.S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. **World J. Gastroenterol**. 14: 4101-4110.

Wilcox, A.L., Marnett, L.J. (1993). Polyunsaturated fatty acid alkoxyl radicals exist as carbon-centered epoxyallylic radicals: a key step in hydroperoxide-amplified lipid peroxidation. **Chem. Res. Toxicol**. 6: 413–416.

Winterbourn, C, C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat. Chem. Biol**, 4:278-286.

Wright, A., Bubb, W.A., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2002). Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. **Photochem. Photobiol**. 76: 35-44.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. **J. Nutr**. 134: 489-492.

Vever-Bizet, C., Dellinger, M., Brault, D., Rougee, M., Bensasson, R.V. (1989). Singlet molecular oxygen quenching by saturated and unsaturated fatty-acids and by cholesterol. **Photochem Photobiol**. 50: 321-325.

Yamamoto, Y., Nagata, Y., Niki, E., Watanabe, K., Yoshimura, S. (1993). Plasmaglutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 133-138.

Yang, M.H., Schaich, K.M. (1996). Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.** 20: 225-236.

Young, A.J., Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.** 385: 20–27.

Zareba, M., Niziolek, M., Korytowski, W., Girotti, A.W. (2005). Merocyanine 540-sensitized photokilling of leukemia cells: role of post-irradiation chain peroxidation of plasma membrane lipids as revealed by nitric oxide protection.

Biochim. Biophys. Acta. 1722:51-59.

Zhang, H., Beckman, J.W., Guengerich, F.P. (2009). Frameshift deletion by *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase Dpo4 T239W is selective for purines and involves normal conformational change followed by slow phosphodiester bond formation. **J. Biol. Chem.** 284: 35144–35153.

Súmula Curricular

Dados Pessoais:

José Pedro Friedmann Angeli

Londrina, 17 de Setembro de 1983

Formação acadêmica:

2007 Doutorado em Bioquímica

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Orientador: Prof Dr. Paolo Di Mascio

Bolsista: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

2005 - 2007 Mestrado em Genética e Biologia Molecular

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

Orientador: Prof Dr Mario Sergio Mantovani

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2001 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

Orientador: Prof Dr Mario Sergio Mantovani

Bolsista: Programa de iniciação científica da Universidade Estadual de Londrina

1999-2001 Ensino Médio

Colegio Marista de Londrina, Londrina, Brasil

Formação complementar

- a) Principles of Fluorescence Techniques. (Carga horária: 32h). Department of Physics. University of Genova, Genova, 2008.
- b) Methods in Genetic Toxicology (Carga horária: 400h). Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Linguas

Português (língua mãe)

Inglês (avançado)

Italiano (avançado)

Alemão (básico)

Publicações

Artigos em preparação e/ou submetidos

- 1- Glyoxal Reacts with Peroxynitrite Yielding Singlet Molecular Oxygen.

Massari, Júlio ; Medinas, DB ; Assunção, NA; **Angeli, JP**; Di Mascio, P; Bechara, EJM.

Journal of the American Chemical Society, 2011. (em revisão).

- 2- Application of Diethyl 3,3'-(9,10-Anthracenediyl)bisacrylate (DADB) coupled to mass spectrometry detection for singlet molecular oxygen detection in live cells.

Angeli, JP; Garcia, CCM; Freitas, FP; Oliveira, MS; Severino, D; Baptista, MS; Medeiros, MHG; Di Mascio, P. (manuscrito em preparação)

3- Low doses of inhaled acetaldehyde induced DNA adducts formation and redox imbalance in rats.

Garcia, CCM., Freitas, FP., Sanchez, AB., Gomes, OF. **Angeli, JP.**, Di Mascio, P., Medeiros. MHG. (manuscrito em preparação)

Artigos em periodicos científicos internacionais

1- Diethyl 3,3'-(9,10-Anthracenediyl)bisacrylate (DADB) a new fluorescent probe for singlet molecular oxygen detection.

Oliveira, MS. Severino, D. Prado, FM. **Angeli, JP.** Baptista, MS. Medeiros, M.HG. Di Mascio, P.

Photochemical and Photobiological Sciences, 2011 (*in press*)

2- Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine in human cells.

Garcia, CCM., **Angeli, JP.**, Freitas, F., Gomes, O., de Oliveira, TF., Loureiro, APM., Di Mascio, P., Medeiros. MHG.

Journal of the American Chemical Society, 2011. (*In press*).

3- Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells

Angeli, JP., Garcia, CCM., Sena, F., Miyamoto, S., Medeiros, MHG., Di Mascio, P.

Free Radical Biology & Medicine, 2011 (*in press*).

4- Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative strêss induced by methylmercury in rats.

Barcelos, GR., Grotto, D., Serpeloni, JM., **Angeli, JP.**, Rocha, BA., de Oliveira Souza, VC., Vicentini, JT., Emanuelli, T., Bastos, JK., Antunes, LM., Knasmuller, S., Barbosa, FJr.

Archives of Tóxicology. 2011 (*in press*).

5- Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS.

Barbosa LF, Cerqueira FM, Macedo AF, Garcia CCM, **Angeli JP**, Schumacher RI, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG.

Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease). 2010. 1802(5):462-71.

6- Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of Silybin in human hepatoma cells (HepG2).

Angeli JP, Barcelos GR, Serpeloni JM, Barbosa Júnior F, Nersesyan A, Mantovani MS.

Mutagenesis. 2009, 25(3):223-9.

7- The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells.

Chequer FM, **Angeli JP**, Ferraz ER, Tsuboy MS, Marcarini JC, Mantovani MS, de Oliveira DP.

Mutat Res. 2009, 31;676(1-2):83-6. 2009.

8- Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells.

Barcelos GR, Angeli JP, Serpeloni JM, Rocha BA, Mantovani MS, Antunes LM.

Environ Mol Mutagen. 2009, 50(9):808-14.

9- Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium.

Grotto D, Barcelos GR, Valentini J, Antunes LM, Angeli JP, Garcia SC, Barbosa F Jr.

Arch Tóxicol. 2009, 83(3):287.

10- Protective effects of beta-glucan extracted from barley against benzo[a]pyrene-induced DNA damage in hepatic cell HepG2.

Angeli JP, Ribeiro LR, Angeli JL, Mantovani MS.

Exp Tóxicol Pathol. 2009, 61(1):83-9.

11- β -glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2.

Angeli JP, Ribeiro LR, Bellini MF, Mantovani MS.

Arch Tóxicol. 2009, 83(1):81-6.

12- Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and b-glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay.

Angeli JP, Camelini CM, Gonzaga MLC, Ribeiro LR, Mantovani, MS.

J Food Compos Analysis, 2009, 22(7-8) 699-703.

13- β -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer.

Mantovani MS, Bellini MF, **Angeli JP**, Oliveira RJ, Silva AF, Ribeiro LR.

Mutat Res Rev. 2008, 658(3):154-61. Review.

14- Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2.

Tsuboy MS, **Angeli JP**, Mantovani MS, Knasmuller S, Umbuzeiro GA, Ribeiro LR.

Tóxicol In Vitro. 2007, (8):1650-5.

15- Anti-clastogenic effect of beta-glucan extracted from barley towards chemically induced DNA damage in rodent cells.

Angeli JP, Ribeiro LR, Bellini MF, Mantovanil.

Hum Exp Tóxicol. 2006, 25(6):319-24.

16- Protective effects of beta-glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes.

Angeli JP, Ribeiro LR, Gonzaga ML, Soares Sde A, Ricardo MP, Tsuboy MS, Stidl R, Knasmueller S, Linhares RE, Mantovani MS.

Cell Biol Tóxicol. 2006, 22(4):285-91.

17- Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells.

Bellini MF, **Angeli JP**, Matuo R, Terezan AP, Ribeiro LR, Mantovani MS.

Tóxicol In Vitro. 2006, 20(3):355-60.

Capítulos em Livros

1. Ribeiro, LR; **Angeli, JPF**; Mantovani, MS. Mushrooms as chemopreventive substances against mutational related pathologies. Topics in Experimental Pathology. Ed:Watanabe, MA. Editora UEL. V.1; p. 159-176.
- 2 **Angeli, JPF**; Martinez, GR; Medeiros, MHG; Di Mascio, P. Evaluation of oxidative DNA damage in aquatic animals: comet assays and 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) levels. Oxidative Strêss in Aquatic Environments. Wiley-Blackwell. To be published in the first semester of 2011.
- 3 Garcia, CCM; **Angeli, JPF**. Medeiros, MHG; Di Mascio. Evaluation of DNA adducts derived from lipid peroxidation by-products in aquatic animals. Oxidative Strêss in Aquatic Environments. Wiley-Blackwell. To be published in the first semester of 2011.