

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANGÉLICA BIANCHINI SANCHEZ

**Mapeamento de adutos de DNA e investigação de
possíveis biomarcadores de poluição urbana.**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

23/02/2017

ANGÉLICA BIANCHINI SANCHEZ

**Mapeamento de adutos de DNA e investigação de
possíveis biomarcadores de poluição urbana.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marisa H. Gennari de Medeiros

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

S211m Sanchez, Angélica Bianchini
Mapeamento de adutos de DNA e investigação de
possíveis biomarcadores de poluição urbana. /
Angélica Bianchini Sanchez. - São Paulo, 2017.
127 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.
Orientador: Medeiros, Marisa Helena Gennari de

1. Poluição Atmosférica. 2. Aldeídos. 3.
Modificações em DNA. 4. Biomarcadores. 5.
Espectrometria de massas. I. T. II. Medeiros,
Marisa Helena Gennari de , orientador.

Inserir página com assinaturas da banca aqui

*Aos meus pais Angela e Odair e ao meu irmão Arthur,
pelo amor e apoio incondicionais,*

*À Profa. Dra. Marisa Medeiros, pelo incentivo, confiança
e amizade.*

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less".

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Marisa Medeiros que me aceitou em seu laboratório ainda como aluna de iniciação científica e me ajudou a crescer academicamente, profissionalmente e também pessoalmente. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e principalmente, por acreditar em meu trabalho. Serei eternamente agradecida por tudo o que aprendi com você.

Ao prof. Paolo Di Mascio, por me receber tão bem em seu laboratório e pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e nas discussões de resultados.

À profa. Graziella Ronsein pela ajuda inestimável com os experimentos com o Orbitrap e à todos os professores do Instituto que me ajudaram, seja durante as disciplinas da graduação ou da pós ou no exame de qualificação e que contribuíram para minha formação direta ou indiretamente.

Aos técnicos cujo trabalho é de extrema importância para o funcionamento dos laboratórios e principalmente, no treinamento dos alunos. Obrigada Izaura, Fernanda, Alessandra, Giovana, Thaís, Osmar, Agda e Edson, por tudo o que aprendi com vocês.

Aos amigos do grupo Sayuri & Marisa & Paolo, com quem estudei, aprendi e também dei muitas risadas entre um experimento e outro – Priscilla, Paty, Thiaguito, Adriano, Lucas, Isabela, obrigada pelos inúmeros cafés em boa companhia. Aos queridos amigos Katia, Emerson e Hellen, muito obrigada pelo apoio e pelas conversas. Ao Vanderson, por me acompanhar no começo das disciplinas, por me ajudar na bancada, por ser um bom amigo. Saudades! À Fernanda Sena, uma das pessoas mais batalhadoras e esforçadas que eu conheço.

À Adriana, minha amiga louca e brilhante, pelo companheirismo, pela diversão e de vez em quando, pelo desespero por resultados no final da noite. Muito obrigada por estar sempre presente. Às demais panteras, Maíra e Carol, por todos os bons momentos que passamos juntas. Aos amigos de laboratório Rodolpho, Mariane, Lola e Victor, pelo cotidiano alegre e leve que vocês proporcionam no laboratório. Victor, não sei nem por onde começar a te agradecer. Por todos os experimentos, pelas conversas, por às vezes só me ouvir para eu poder organizar as ideias e por ser um aluno excelente! Obrigada por tudo.

Aos queridos Dr. Florêncio e Dra. Camila que me iniciaram e me orientaram na bancada, me treinaram nos espectrômetros de massas e que se tornaram meus grandes amigos. Foi e sempre será uma honra aprender com vocês.

Às minhas queridas Lulus: Fer, Carol, Rê, Cris e Henri - vocês são meu porto seguro. E aos bolinhas também: Léo, Roger e Vlad. E um agradecimento especial

à minha irmã de coração, Talita. Minha avó sempre esteve certa, você é meu anjo da guarda. Obrigada, não só a você, mas também ao Peterson e a Lucy, por juntos termos formado uma família tão linda, pelo companheirismo, amizade, força, apoio emocional, financeiro, enfim. Obrigada, obrigada, obrigada. Eu amo vocês.

Ao meu querido amigo Guilherme por não me deixar fixar demais os pés no chão, por me aconselhar e incentivar a ser uma pessoa melhor. Obrigada pelos momentos de diversão e amizade.

Aos queridos compadres e comadres Pablo e Jhol, Andressa e Joice e ao meu lindo afilhado Martin. Aos frangos de Campinas: Simone, Velhinho, Gil e Karlitchos, Karla e Cebola, Hugo e Mariana, Júlia e Roberto. À minha pocket friend mais linda Kat's.

Aos primos-irmãos de convivência, Manu, Marcelo e Vinny. Vocês são tipo prêmio de loteria das famílias. E falando em família, o incentivo e apoio de vocês e das tias Rose e Ana foram fundamentais para mim. Amos vocês.

À minha família. Aos meus avós que sempre fizeram questão de mostrar que estavam orgulhosos de ter uma neta na universidade pública. Que fizeram de tudo para ajudar na minha criação e de meu irmão. Minha memória estará sempre com vocês, com muito amor. Aos meus pais e meu irmão, por todo amor e carinho que vocês me dão, pelo incentivo e compreensão. Por construírem um lugar que eu sempre chamarei de casa. Muito obrigado.

Por fim, gostaria de agradecer ao apoio financeiro das agências de fomento de pesquisa. Muitas vezes esquecemos que a ciência no Brasil é inviável sem a ajuda dessas agências. Mais do que nunca, esse é o momento de agradecer a existência delas. Obrigada ao CNPq pela bolsa de doutorado direto e à FAPESP pelo apoio financeiro pelo Cepid – Redoxoma.

RESUMO

Sanchez, A. B. **Mapeamento de adutos de DNA e investigação de possíveis biomarcadores de poluição urbana.** 2017, (127p). Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Globalmente, os problemas de poluição são mais severos em regiões densamente povoadas ou industrializadas. A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) é um exemplo de megalópole com um conjunto único de emissões, insolação e condições meteorológicas que determinam sua elevada poluição atmosférica. Entre os compostos mais tóxicos presentes nesta atmosfera estão os aldeídos, moléculas de grande potencial mutagênico e carcinogênico que podem ser originados da oxidação de combustíveis fósseis e etanol, além de possuir fontes endógenas. Sua adição covalente em biomoléculas como DNA e proteínas é estudada como mecanismo de sua ação mutagênica e carcinogênica.

Desenvolvemos um método ultrasensível de HPLC acoplado à espectrometria de massas para análise simultânea de vários adutos de DNA com aldeídos presentes na atmosfera urbana como formaldeído, acetaldeído, crotonaldeído e acroleína, além de modificações oxidativas. Foram utilizados para validação da metodologia células modelo de Anemia Fanconi e tecido de músculo de ratos modelo para ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica), os quais apresentaram níveis basais dos adutos de formaldeído, acetaldeído, acroleína e crotonaldeído. Outros modelos de exposição aos aldeídos foram utilizados na validação desta metodologia, como a fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis sendo que a formação desses adutos também foi verificada em DNA de timo de bezerro.

Pela primeira vez, foi mostrada a formação inequívoca do aduto de acetaldeído (1,*N*²-propanodGuo) em pulmões e cérebros de ratos *Wistar* expostos à 10 ppb de acetaldeído isotopicamente marcado e sua estrutura confirmada por espectrometria de massas de alta resolução. Esse resultado comprova o mecanismo de formação do aduto por meio da adição de duas moléculas de acetaldeído *in vivo* por inalação e em baixa concentração, sendo crucial para formulação de políticas públicas por agências ambientais.

Palavras-chave: poluição atmosférica, aldeídos, adutos de DNA, espectrometria de massas.

ABSTRACT

SANCHEZ, A. B. **DNA adducts mapping and investigation of possible biomarkers of urban pollution exposure**. 2017. (127p). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Globally, air pollution problems are more severe in densely populated or industrialized regions. The Metropolitan Region of São Paulo (RMSP) is an example of a megalopolis with a unique set of emissions, insolation and meteorological conditions that determinates its high atmospheric pollution. Among the most toxic compounds present in this atmosphere are aldehydes, molecules of great mutagenic and carcinogenic potential that can be originated from the oxidation of fossil fuels and ethanol, besides having endogenous sources. Its covalent addition in biomolecules like DNA and proteins is studied as a mechanism of its mutagenic and carcinogenic action.

We developed an ultra-sensitive HPLC method coupled with mass spectrometry for the simultaneous analysis of several DNA adducts with aldehydes present in the urban atmosphere as formaldehyde, acetaldehyde, crotonaldehyde and acrolein and oxidative lesions as well. To validate the method, we used a cell model of Fanconi Anemia and muscle tissue from a rat model for ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) which presented basal levels of the adducts of formaldehyde, acetaldehyde, acrolein and crotonaldehyde. Other models of exposure to aldehydes were used to validate the method, such as tobacco and cannabis smoke and the formation of these adducts was also verified in Calf Thymus DNA.

For the first time, the unequivocal formation of the acetaldehyde (1, *N*²-propanodGuo) adduct was shown in lungs and brains of Wistar rats exposed to 10 ppb of isotopically labeled acetaldehyde and its structure was confirmed by high

resolution mass spectrometry. This result confirms the mechanism of adduct formation by the addition of two molecules of acetaldehyde *in vivo* by inhalation of a low concentration of acetaldehyde, being crucial for the formulation of public policies by environmental agencies.

Key words: atmospheric pollution, aldehydes, DNA adducts, mass spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|--|
| 1, <i>N</i> ⁶ -εdAdo | 1, <i>N</i> ⁶ -Eteno-2'-desoxiadenosina |
| 3, <i>N</i> ⁴ -εdCyd | 3, <i>N</i> ⁴ -Eteno-2'-desoxicitidina |
| <i>N</i> ² ,3-εdGuo | <i>N</i> ² ,3-Eteno-2'-desoxiguanosina |
| 1, <i>N</i> ² -εdGuo | 1, <i>N</i> ² -Eteno-2'-desoxiguanosina |
| [¹⁵ N ₅]1, <i>N</i> ² -εdGuo | [¹⁵ N ₅]1, <i>N</i> ² -Eteno-2'-desoxiguanosina |
| 8-oxodGuo | 8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina |
| [¹⁵ N ₅]-8-oxodGuo | [¹⁵ N ₅]-8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina |
| 1, <i>N</i> ² -γ-OH- propanodGuo | 1, <i>N</i> ² -(γ-Hidroxi)propano -2'-desoxiguanosina |
| 1, <i>N</i> ² -α-OH- propanodGuo | 1, <i>N</i> ² -(α-Hidroxi)propano -2'-desoxiguanosina |
| 1, <i>N</i> ² -propanodGuo | 1, <i>N</i> ² -(α-Metil,γ-hidroxi)propano -2'-desoxiguanosina |
| [¹⁵ N ₅]1, <i>N</i> ² -propanodGuo | [¹⁵ N ₅]1, <i>N</i> ² -(α-Metil,γ-hidroxi)propano- 2'desoxiguanosina |
| 1, <i>N</i> ² -HO-metildGuo | 1, <i>N</i> ² -hidroxi-metil-2'-deoxiguanosina |
| AA | Acetaldeído |
| ACR | 2-Propenal ou acroleína |
| AF | Anemia de Fanconi |
| AKR | Aldo-ceto redutase |

| | |
|----------------|---|
| ALDH | Aldeído desidrogenase |
| APNG | alquilpurina-DNA- <i>N</i> -glicosilase |
| BER | sigla em inglês para Reparo por excisão de base |
| CAT | Catalase |
| CRT | <i>Trans</i> -2-butenal ou crotonaldeído |
| dGuo | 2'-Desoxiguanosina |
| ELA | Esclerose Lateral Amiotrófica |
| ELAf | Esclerose Lateral Amiotrófica familiar |
| ERs | Espécies reativas |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| ERN | Espécie reativa de nitrogênio |
| ESI | sigla em inglês para <i>Ionização por eletrospray</i> |
| FDA | sigla para <i>U.S. Food and Drug Administration</i> |
| GGR | sigla em inglês para Reparo do genoma global |
| Gpx | Glutathiona peroxidase |
| HPLC-ESI-MS/MS | sigla em inglês para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por eletrospray |

| | |
|---------------------|---|
| HRR | sigla em inglês para Reparo por recombinação homóloga |
| IARC | sigla em inglês para Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer |
| LPO | Peroxidação lipídica |
| M ₁ dGuo | Pirimido-[1,2α]purina-10(3H)-ona-2'-desoguanosina |
| MDA | Malonodialdeído |
| MeCN | Acetonitrila |
| MMR | do inglês <i>Mismatch Repair</i> |
| MS | sigla em inglês para Espectrômetro de massas |
| NIH | do inglês <i>National Institutes of Health</i> |
| NER | sigla em inglês para Reparo por excisão de nucleotídeo |
| NHEJ | sigla em inglês para reparo por ligação de pontas não homologas |
| OGG1 | 8-oxoguanina-DNA-glicosilase |
| PCR | sigla em inglês para Reação em cadeia da polimerase |
| PM | sigla em inglês para Material particulado |
| Prx | Peroxirredoxina |

| | |
|----------------------|--|
| SOD1 | Cu,Zn-Superóxido dismutase |
| SOD1 ^{G93A} | Enzima Cu,Zn-superóxido dismutase humana com substituição da glicina 93 por alanina. |
| SPE | sigla em inglês para Extração em fase sólida |
| SRM | sigla em inglês para Monitoramento de Reação Selecionada |
| TCR | sigla em inglês para Reparo acoplado à transcrição |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. CAT – catalase; Gpx – glutathione peroxidase; L[•] – radical alquila; LH – lipídios; LO[•] – radical alcóxila; LOH – hidróxido orgânico; LOO[•] – radical peróxila; LOOH – hidroperóxido orgânico; Mⁿ⁺ – metal de transição; MPO – mieloperoxidase; Prx – peroxirredoxina; SOD – superóxido dismutase (adaptado de Valko et al., 2007).

Figura 2. Formação de 8-oxodGuo pela reação com oxigênio singlete ou radical hidroxila (Di Mascio *et al.*, 2006).

Figura 3. Esquema representativo das reações de iniciação e propagação de peroxidação lipídica, Adaptado de Freitas, 2014.

Figura 4. Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação. Por Medeiros, 2009.

Figura 5. Adutoma de pulmões de fumantes (círculo escuro) e não fumantes (círculo claro). Por Kanaly et al (2006).

Figura 6. Diagrama do aparato usado para coleta do extrato da fumaça de cigarro e do cigarro de cannabis.

Figura 7. Fig. 1. Sistema para exposição prolongada por inalação de ratos Wistar a [¹³C₂] acetaldeído. A - bombas de ar de diafragma; B - ciclone para remoção de partículas; C - reguladores de pressão de gás; D - purgador de água / humidificador; E - purificadores de ar (preenchidos com mistura Purafil select) com filtros; F - confluência de mistura de gases; J - resistências hidrodinâmicas do divisor calibrado; K - linhas de ar purificadas com fluxo ajustado para 12 L min⁻¹; Gaiolas em L adaptadas para exposição por inalação de ratos (as gaiolas L0 e L10ppb têm tampas de vidro fechadas); M - detector de queda de pressão; V - válvula de aperto (abre o fornecimento de ar de reserva apenas em caso de uma queda de energia ou falha da bomba).

Figura 8. Espectro de massas do aduto 8-oxodGuo.

Figura 9. Espectro de massas do aduto 1,N²-εdGuo.

Figura 10. Espectro de massas do adutos (A) 1,N²-propanodGuo, (B) [¹³C₄]-1,N²-propanodGuo, (C) [¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo e (D) [¹⁵N₅, ¹³C₄]-1,N²-propanodGuo.

Figura 11. Espectro de massas do aduto (A) γ-1,N²-HOpropanodGuo, (B) α-1,N²-HOpropanodGuo e (C) [¹⁵N₅]-1,N²-HOpropanodGuo

Figura 12. Espectro de massas do aduto (A) 1,N²-MeOHdGuo e seu padrão isotopicamente marcado, (B) [¹⁵N₅]-1,N²-MeOHdGuo.

Figura 13. Cromatograma representativo de amostra de DNA de timo de bezerro contendo 10 fmol de padrões internos em (A) e 2 fmol dos adutos: 1,N²-HO-medGuo (B); 8-oxodGuo (C); 1,N²-HO-propanodGuo (D); 1,N²-εdGuo (E), 1,N²-propanodGuo (F) e o detector de UV em 260nm.

Figura 14 Curvas de calibração para os adutos 1, N²-HO-medGuo, 8-oxodGuo, 1,N²-HO-propanodGuo, 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo.

Figura 15. Níveis de adutos de DNA encontrados em solução de DNA de timo de bezerro tratado com a fumaça de tabaco e de cannabis, n=3. * representa P<0,05; ** representa P<0,01 e ***P<0,001, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste.

Figura 16. Quantificação de adutos de DNA em células MEF tratadas com 2 mM de acetaldeído (AA). * representa P<0,05; ** representa P<0,01 e ***P<0,001, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, n=6.

Figura 17. Quantificação de adutos de DNA em ratos controle e transgênicos para o gene Sod1^{G93A}, sintomáticos. * representa P<0,05; pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, n=4.

Figura 18. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro controle. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 19. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro de ratos que inalaram ar purificado (0 ppb). (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o

aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 20. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro de ratos que inalaram 10 ppb de [$^{13}\text{C}_2$]-acetaldeído. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 21. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão controle. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 22. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão de ratos que inalaram ar purificado (0 ppb). (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 23. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão de ratos que inalaram 10 ppb de [$^{13}\text{C}_2$]-acetaldeído. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Figura 24. Níveis de 1,N²-propanodGuo em cérebro e pulmão de ratos controle, 0 ppb e 10 ppb. * representa $P < 0,05$; ** representa $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, $n=5$.

Figura 25. Cromatograma representativo e espectro de MS³ para (A) 1,N²-propanodGuo, (B) [$^{13}\text{C}_2$]-1,N²-propanodGuo, (C) [$^{13}\text{C}_4$]-1,N²-propanodGuo and (D) [$^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_5$]-1,N²-propanodGuo (padrão interno) em um pool de amostras de DNA de pulmão tratadas com 10 ppb de [$^{13}\text{C}_2$]-acetaldeído. (dR = 2´deoxyribose).

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Gradiente de 0,1% de ácido fórmico em solução aquosa e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção dos adutos de DNA.

Tabela 3.2. Transições escolhidas para os adutos de DNA e seus respectivos padrões internos analisados por HPLC-ESI⁺-MS/MS.

Tabela 1.3. Composição do meio de PCR para genotipagem dos ratos SOD1^{G93A}.

Tabela 3.4. Gradiente utilizado para a purificação das amostras de DNA por HPLC-UV.

Tabela 3.5. Gradiente utilizado para a quantificação dos adutos de 1,N²-propanodGuo nas amostras por microLC-ESI⁺-MS/MS.

Tabela 3.6. Transições monitoradas no método de SRM para detecção e quantificação dos adutos endógenos e exógenos de 1,N²-propanodGuo.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 24 |
| 1.1. Modificações em biomoléculas e suas implicações biológicas..... | 24 |
| 1.1.1. Espécies reativas..... | 24 |
| 1.1.2. Estresse Redox e Defesas antioxidantes | 27 |
| 1.1.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica | 29 |
| 1.1.3. Lesões de DNA..... | 32 |
| 1.1.4. Lipoperoxidação..... | 34 |
| 1.2. Poluição Urbana..... | 37 |
| 1.2.1. Aldeídos: Fontes, modificações em DNA e implicações biológicas | 39 |
| 1.2.1.1. Formaldeído | 42 |
| 1.2.1.2. Acetaldeído..... | 44 |
| 1.2.1.3. Acroleína | 45 |
| 1.2.2. Níveis e métodos de detecção..... | 46 |
| 1.3. Reparo de DNA..... | 49 |
| 2. OBJETIVOS | 52 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 3.1. Reagentes..... | 53 |
| 3.2. Equipamentos | 54 |
| 3.3. Síntese, purificação e caracterização dos padrões de adutos de DNA..... | 54 |
| 3.3.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo..... | 55 |
| 3.3.2. Síntese e purificação de 1,N ² -εdGuo e [¹⁵ N ₅]-1,N ² -εdGuo..... | 55 |
| 3.3.3. Síntese e purificação de 1,N ² -propanodGuo, [¹³ C ₄]-1,N ² -propanodGuo e [¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₅]-1,N ² -propanodGuo | 55 |
| 3.3.4. Síntese e purificação de 1,N ² -HO-propanodGuo e [¹⁵ N ₅]-1,N ² -HO-propanodGuo..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 3.3.5. Síntese, purificação e caracterização de 1,N ² -HO-medGuo e [¹⁵ N ₅] 1,N ² -HO-medGuo | 56 |
| 3.4. Desenvolvimento da metodologia para quantificação dos adutos de DNA por HPLC-ESI ⁺ -MS/MS..... | 57 |
| 3.4.1. Estudo de formação dos adutos em DNA de timo de bezerro expostos a extratos de fumaça de cigarro de nicotina ou cigarro de Cannabis sativa | 59 |
| 3.4.1.1. Preparação dos extratos dos cigarros de tabaco e cannabis..... | 59 |
| 3.4.1.2. Incubação de DNA de timo de bezerro com os extratos de cigarro de tabaco e cannabis..... | 60 |
| 3.4.1.3. Precipitação e Hidrólise do DNA..... | 60 |
| 3.4.1.4. Quantificação dos adutos de DNA encontrados na reação entre o extrato dos cigarros de tabaco e cannabis e o DNA de timo de bezerro | 61 |
| 3.4.2. Estudo de formação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi. | 61 |
| 3.4.2.1. Cultura celular..... | 61 |
| 3.4.2.2. Tratamento de células MEF com acetaldéido..... | 61 |
| 3.4.2.3. Extração de DNA | 62 |
| 3.4.2.4. Hidrólise do DNA..... | 63 |
| 3.4.2.5. Quantificação dos adutos de DNA nas células MEF..... | 63 |
| 3.4.3. Quantificação de adutos de DNA em modelo animal de Esclerose Lateral Amiotrófica | 64 |
| 3.4.3.1. Genotipagem | 64 |
| 3.4.3.2. Avaliação, coleta de órgãos e eutanásia..... | 66 |
| 3.4.3.3. Extração e hidrólise de DNA | 66 |
| 3.4.3.4. Quantificação dos adutos de DNA nos animais ALS | 67 |
| 3.5. Análise da formação de 1,N ² -propanodGuo exógeno em ratos expostos ao acetaldéido isotopicamente marcado por inalação..... | 67 |
| 3.5.1. Tratamento dos ratos Wistar com acetaldéido isotopicamente marcado . | 67 |
| 3.5.2. Extração e hidrólise de DNA | 69 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| 3.5.3. Metodologia de purificação das amostras - Enriquecimento e pré-purificação das amostras por extração em fase sólida (SPE) e HPLC-UV..... | 71 |
| 3.5.4. Detecção dos adutos endógenos e exógenos de 1,N ² -propanodGuo por microLC/MS/MS em pulmões e cérebros de ratos tratados com acetaldeído isotopicamente marcado..... | 72 |
| 3.5.5. Análise da formação de 1,N ² -propanodGuo endógeno e exógeno por Nano-LC/ESI-HRMS ³ | 74 |
| 4. RESULTADOS..... | 76 |
| 4.1. Caracterização de adutos de DNA..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1.1. 8-oxodGuo..... | 76 |
| 4.1.2. 1,N ² -εdGuo..... | 77 |
| 4.1.3. 1,N ² -propanodGuo..... | 77 |
| 4.1.4. 1,N ² -HO-propanodGuo..... | 79 |
| 4.1.5. 1,N ² -HO-medGuo..... | 80 |
| 4.2. Desenvolvimento da metodologia para detecção dos adutos de DNA por HPLC-ESI ⁺ -MS/MS..... | 82 |
| 4.2.1. Estudo de formação dos adutos de DNA de timo de bezerro expostos a fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis..... | 86 |
| 4.2.2. Avaliação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi..... | 87 |
| 4.2.3. Avaliação de adutos de DNA em modelo murino de Esclerose Lateral Amiotrófica..... | 89 |
| 4.4. Tratamento dos ratos Wistar com acetaldeído isotopicamente marcado..... | 91 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 102 |
| 5.1. Desenvolvimento da metodologia para detecção dos adutos de DNA por HPLC-ESI-MS/MS..... | 102 |
| 5.1.1. Estudo de formação dos adutos de DNA de timo de bezerro expostos a fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis..... | 104 |
| 5.1.2. Avaliação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi ... | 105 |
| 5.1.3. Avaliação de adutos de DNA em modelo de rato de Esclerose Lateral Amiotrófica..... | 107 |
| 5.2. Tratamento dos ratos Wistar com acetaldeído isotopicamente marcado..... | 108 |

| | |
|--|------------|
| 6. CONCLUSÕES | 110 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 112 |
| ANEXOS..... | 122 |
| SÚMULA CURRICULAR..... | 124 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Modificações em biomoléculas e suas implicações biológicas

1.1.1. Espécies reativas

Atualmente o estudo de espécies reativas mostra que esta classe de compostos não está apenas associada a processos toxicológicos, mas também participa de diversos processos fisiopatológicos agindo como importante mediadora, por exemplo, na sinalização celular ou como mecanismo de defesa contra agentes infectantes (Winterbourn, 2008; Murphy *et al.*, 2011; Lamas *et al.* 2015). A primeira pista de que as espécies reativas poderiam participar de sistemas biológicos foi encontrada em 1900, quando Gomberg identificou radicais livres orgânicos em sistemas vivos. Até então, essa hipótese era considerada impossível devido ao fato dos radicais livres apresentarem tempo de meia vida muito baixos. Em 1956, Harman propôs a teoria dos radicais livres no envelhecimento, o que levou a diversos trabalhos sobre a toxicidade desses compostos. O interesse pelo papel das espécies redox reativas na fisiopatologia foi despertado anos depois quando em 1969, McCord e Fridovich identificaram a enzima superóxido dismutase (SOD), o primeiro mecanismo de defesa enzimático antioxidante encontrado, criando uma nova e rica área de pesquisa.

O termo “espécies reativas” contempla três classes de compostos de átomos, moléculas ou íons: as espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Essas espécies podem ainda ser classificadas em compostos radicalares (radicais livres) ou compostos não radicalares (Winterbourn, 2008). Radicais livres são

átomos, íons ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, permitindo a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Radicais livres podem ser formados pela clivagem homolítica de moléculas, por transferência eletrônica e reações de oxidação ou redução. Os compostos não radicalares não possuem elétrons livres sendo, portanto, menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas nas vizinhanças (Carrocho *et al.*, 2013).

Entre as espécies reativas de oxigênio mais estudadas estão o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado, principalmente, na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, por meio de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase e também pode ser formado pela redução monoelétrica de O_2 (Figura 1). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um intermediário não radicalar formado pela reação de dismutação de $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima SOD, pela redução de oxigênio e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomas. Em presença de íons de metal de transição, por meio da reação do tipo Fenton, gera radical hidroxila ($HO\cdot$), o radical mais reativo e mais lesivo conhecido. Possui um raio de difusão muito pequeno dentro da célula, seu tempo de meia vida é de apenas $1,0 \times 10^{-9}$ s. O radical hidroxila causa modificações no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, além de peroxidação lipídica, fonte de radicais peroxila ($RO_2\cdot$) e alcoxila ($RO\cdot$) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O próprio oxigênio, em seu estado singlete, altamente reativo, pode ser formado em sistemas biológicos (Di Mascio, 1985; Sies, 1993). Além disso, outras espécies reativas podem ser formadas pelo metabolismo de aminoácidos, formando espécies de nitrogênio, como o óxido

nítrico (NO^\bullet), formado principalmente pela reação entre L-arginina e oxigênio, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase e que, apesar de contribuir como sinalizador em diversos processos biológicos pode também, assim como os ERO's, desencadear lesões em biomoléculas e produzir radicais ainda mais reativos (Toledo e Augusto, 2012). O peroxinitrito (ONOO^-) formado pela reação com o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Saran, Michel e Bors, 1990), é capaz de gerar ânion radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}\text{NO}_2$), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), e causar danos em DNA, proteínas e lipídios (Ferrer-Sueta e Radi, 2009; Toledo e Augusto, 2012).

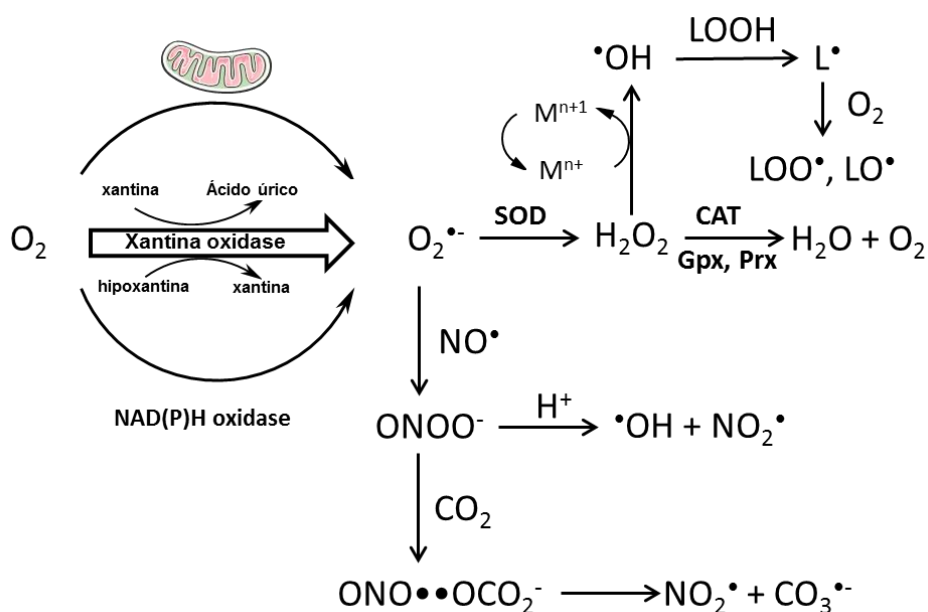


Figura 1. Principais vias de formação de algumas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. CAT – catalase; Gpx – glutathiona peroxidase; L• – radical alquila; LH – lipídios; LO• – radical alcoila; LOO• – radical peroxila; M^{n+} – metal de transição; Prx – peroxirredoxina; SOD - superóxido dismutase (adaptado de Valko et al., 2007).

Entre as fontes exógenas de espécies reativas estão: radiação UV, tabagismo, poluentes, dieta e prática de exercícios, pesticidas, solventes industriais, íons metálicos como Cobre e Ferro, etc. (Herrling *et al.*, 2006).

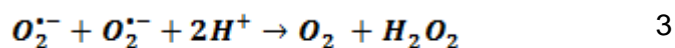
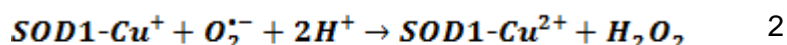
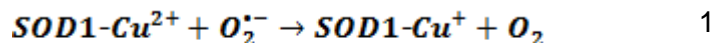
1.1.2. Estresse Redox e Defesas antioxidantes

O conceito de estresse redox define-se atualmente como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular” (Jones, 2006).

Antioxidante é definido como uma molécula que em baixa concentração inibe ou minimiza processo de oxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007). As defesas antioxidantes são classificadas em enzimáticas e não enzimáticas (moléculas de baixo peso molecular).

Entre as defesas enzimáticas, destaca-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma Cu,Zn-SOD, presente principalmente no citosol e meio extracelular, e a Mn-SOD localizada na mitocôndria. Realiza a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. A Cu,Zn-SOD possui massa molecular de 32000 Da, sendo formada por duas subunidades idênticas, cada uma com um canal, progressivamente mais estreito com resíduos carregados, que dirige o $O_2^{\bullet-}$ para o sítio ativo (Tainer *et al.*, 1982). Cada sítio ativo contém um Cu^{2+} e um Zn^{2+} unidos por um ligante comum, o anel imidazólico da histidina 61. O Cu^{2+} está ligado a outras três histidinas e o Zn^{2+} , a outras duas histidinas e um ácido aspártico. O Zn^{2+} é responsável pela geometria do sítio ativo e pelo posicionamento correto do Cu^{2+} , o qual atua diretamente na

dismutação, alternando entre $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (Hodgson e Fridovich, 1975). As equações 1-3 mostram o ciclo de oxidação e redução do cobre da enzima para a realização da dismutação do radical superóxido.



O peróxido de hidrogênio é dismutado pela enzima Catalase (CAT). A heme proteína é encontrada nos peroxissomos e converte duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e oxigênio em uma reação de duas etapas e assim como no mecanismo da SOD, a mesma molécula é oxidada e depois, reduzida (Putnam, 2000). Outras enzimas importantes para a defesa antioxidante são as tioredoxinas (Trx), tioproteínas que conferem atividade redutora de pontes dissulfeto em diversas proteínas e se oxidam no processo, por isso, atuam em conjunto as tioredoxinas redutases (TrxR), que utilizam NADPH para reduzir a Trx. As peroxirredoxinas (Prx) e as glutathione peroxidases (Gpx) são também importantes redutoras de peróxido de hidrogênio, ambas capazes ainda de reduzir peróxidos orgânicos. As Gpx utilizam glutathione (GSH) como fonte de prótons e elétrons para as reações de redução. Cataliticamente, as Prx se auto-oxidam e são reduzidas por tioredoxinas (Trx) (Lu e Holmgren, 2014).

Entre os antioxidantes de baixa massa molecular, o tri-peptídeo Glutathione (γ -glutamil-cisteinil-glicina) é considerado a molécula mais abundante entre os antioxidantes endógenos. Cada molécula de GSH pode doar um elétron e por isso, duas moléculas de GSH podem doar dois elétrons e produzir a forma oxidada GSSG, formando um sistema tampão redox. É ubiquamente presente em humanos, em altas concentrações (1-10 mM).

Os carotenoides são um grupo de compostos onde se destacam os β -carotenos, precursores da vitamina A e que agem, principalmente, como sequestradores de peróxidos lipídicos no intestino.

Levando em conta o conhecimento de que a principal carga de defesa antioxidante é realizada por defesas enzimáticas (Sies, 2015), os antioxidantes de baixo peso molecular, principalmente os exógenos, apesar de interagir diretamente com espécies reativas, realizam principalmente papel de sinalizadores na resposta ao estresse redox. Sabe-se, por exemplo, que esses antioxidantes, quando convertidos nas formas oxidadas (durante o estresse oxidativo) promovem modificação covalente na proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) que por sua vez ativa o fator de transcrição Nrf2, responsável pela transcrição de enzimas antioxidantes (Ursini *et al.*, 2014).

1.1.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA, também conhecida como a doença de Lou Gehrig) foi descrita pela primeira vez em 1869, pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot como uma doença caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores acarretando atrofia, paralisia e morte (Cozzolino *et al.*, 2008). A doença se inicia pela paralisia de um

membro de um lado específico e a morte acaba ocorrendo por insuficiência respiratória, quando os neurônios responsáveis pelo movimento do diafragma são atingidos. O início da doença ou o primeiro diagnóstico é feito entre 50 e 70 anos, e por já se tratar de um estágio avançado, o paciente tem de 2 a 5 anos de vida após o diagnóstico. A doença atinge mais homens do que mulheres (1,6 vezes mais) (Kiernan *et al.*, 2011; Krueger *et al.*, 2013). Recentemente, uma revisão dos dados mundiais verificou variação nas taxas de incidência, mortalidade e prevalência de 0,4 – 3,7; 0,7 – 2,5 e 1,9 – 11,3 por 100.000 habitantes, respectivamente (Chio *et al.*, 2012).

Não há ainda um tratamento efetivo para ELA. Hoje, existe somente um medicamento aprovado, o Riluzol, (6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina), o qual aumenta a sobrevida do paciente em alguns poucos meses, além de outros diversos tratamentos paliativos (Carrì *et al.*, 2003). A utilização de células-tronco para regeneração dos neurônios motores também tem sido estudada (Silani *et al.*, 2004; Boillée *et al.*, 2006). Também foram realizados diversos estudos com o tratamento da doença com antioxidantes como a vitamina E, *N*-acetilcisteína, seleginina, catalase, coenzima-Q e porfirinas e manganês que obtiveram sucesso em modelos animais, mas não nas triagens em humanos (Goodall e Morrison, 2006; Barber *et al.*, 2006). É consenso que ELA é uma desordem multifatorial e multissistêmica que, afetando a integridade e o funcionamento de neurônios motores e de células não neuronais, resulta em fenótipo comum (Mitchell e Borasio, 2007; Cozzolino *et al.*, 2012).

A falta de biomarcadores específicos para um estágio precoce da doença ainda é necessária em humanos. O diagnóstico é feito tardiamente, quando a

deficiência motora já é observada, situação na qual o paciente já perdeu mais de 50% de seus neurônios motores.

Mecanismos complexos envolvendo estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato (Glu), formação de agregados protéicos (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2002), processos neuro-inflamatórios (Carrì *et al.*, 2003), disfunções mitocondriais e defeitos no transporte axonal (Boillée *et al.*, 2006) estão envolvidos na degeneração de neurônios motores.

Dentre os casos familiares de ELA (ELAf), os quais representam 10 % dos casos totais, defeitos genéticos associados ao gene *Sod 1* têm recebido maior atenção. Mutações pontuais neste gene, o qual codifica a forma citosólica da enzima Cu,Zn-SOD, estão presentes em cerca de 20 % dos casos de ELAf (Carrì *et al.*, 2003). Já foram reportadas mais de 100 mutações diferentes no gene *Sod 1* em pacientes de ELAf, localizadas no sítio ativo, nas folhas β e na interface entre os monômeros. A mutação G93A é a mais estudada mundialmente, pois foi utilizada com sucesso na criação de ratos e camundongos transgênicos modelo de ALS em 1994 – um grande marco nos estudos de ELA. Os animais transfectados com SOD G93A humana desenvolvem o quadro clínico de ELA, constituindo um excelente modelo para o estudo dos mecanismos da doença, tanto familiar quanto esporádica.

A grande vantagem de um modelo animal que mimetiza uma patologia humana é a possibilidade de seguir a progressão da doença, e desenvolver terapias em potencial. Entretanto, o nível de expressão necessário nos pacientes heterozigotos para a SOD mutante exercer seu efeito tóxico é muito menor do que nos roedores transgênicos, nos quais é necessário um aumento de 10-30 vezes no nível da proteína mutante para induzir o fenótipo patológico.

Isto se deve a diferenças entre camundongo e homem, as quais não devem ser desprezadas na análise dos resultados (Bendotti *et al.*, 2004).

Ainda não se sabe por que a forma mutante Cu,Zn-SOD é particularmente tóxica para os neurônios motores, causando ELA. Mais de uma década de estudos extensivos forneceram fortes evidências de que um “ganho de função tóxica” ao invés da perda da função enzimática normal da enzima pode ser a causa da doença. Primeiramente, trata-se de um fenótipo dominante em humanos. A maioria das formas mutantes apresentam atividade superóxido dismutásica normal e animais nocautes para o gene *Sod 1* não desenvolvem ELA, enquanto que animais super-expressando formas mutantes de SOD desenvolvem fenótipo muito similar (Goodall e Morrison, 2006).

1.1.3. Lesões de DNA

A integridade e a estabilidade da informação genética são cruciais para manutenção da vida. O DNA, no entanto, não é inerte e possui inúmeros sítios de interação química com seu ambiente. O DNA pode sofrer vários tipos de lesões resultantes do ataque às bases nitrogenadas, aos resíduos de desoxirribose e às ligações fosfodiéster (Gates, 2009). Diversas fontes, como radiação UV, radiação ionizante, agentes genotóxicos presentes no ar, na alimentação, na fumaça de cigarro e poluição, ataque por radicais livres e subprodutos do metabolismo podem modificar o DNA. É estimado que uma célula, sozinha, pode sofrer até um milhão de modificações em DNA por dia (Lodish *et al.*, 2005).

Acredita-se que essas lesões atuem na carcinogênese e em diversas doenças. Entre as mais de 80 lesões oxidativas de DNA identificadas até hoje

(Ravanat e Cadet, 2011), a mais estudada é a 7,8-dihidro-2'-deoxyguanosina (8-oxodGuo), que pode ser formada pela reação direta da 2'-desoxiguanosina com radicais hidroxila e oxigênio singlete (Cadet *et al.*, 2002; Ravanat *et al.*, 2004). A Figura 2 mostra a reação de formação da 8-oxodGuo pelo radical hidroxila e pelo oxigênio singlete.

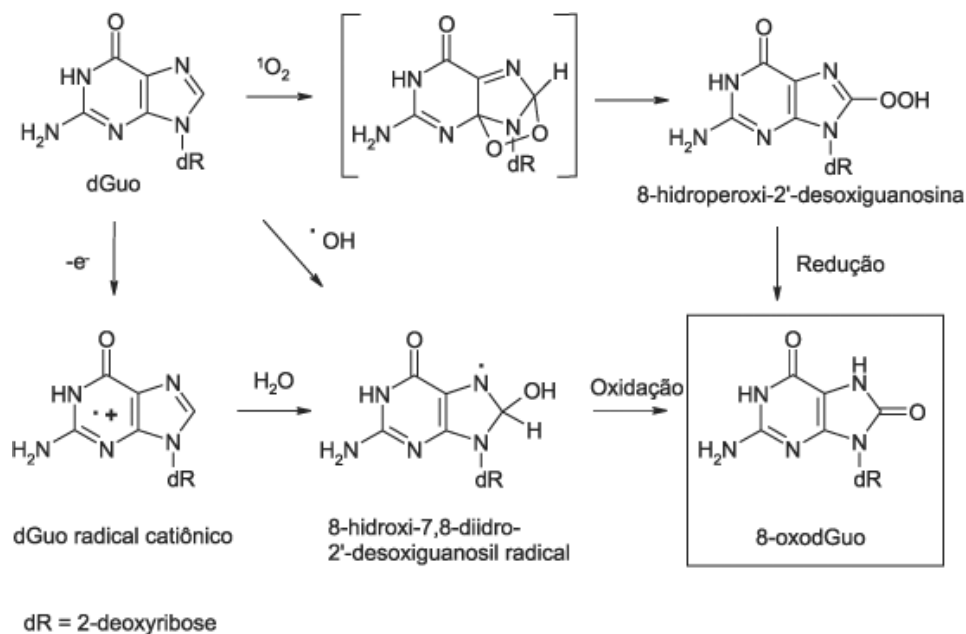


Figura 2. Formação de 8-oxodGuo pela reação com oxigênio singlete ou radical hidroxila (Di Mascio *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos utilizam a 8-oxodGuo como biomarcador de exposição ao estresse redox por ser facilmente detectada (Collins *et al.*, 2004). Trata-se de uma lesão mutagênica em células de bactérias e mamífero, levando a transversões $G \rightarrow T$ (Cheng *et al.*, 1992; Le Page *et al.*, 1995; Shibutani *et al.*, 1991). Por meio de técnicas como o HPLC acoplado à espectrometria de massas ou detector eletroquímico sabe-se que os níveis basais de 8-oxodGuo são altos, em torno de uma lesão para cada 10^6 nucleosídeos modificados (Cadet, Douki e Ravanat, 2011).

Além das oxidações, são importantes em processos fisiopatológicos os adutos de alquilação de DNA, como os adutos exocíclicos de DNA, os eteno adutos e propano adutos, formados por subprodutos de lipoperoxidação, metabolismo e agentes exógenos.

1.1.4. Lipoperoxidação

O processo de peroxidação lipídica, ou seja, a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular está envolvido em diversos processos patológicos tais como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, inflamação e câncer. O mecanismo mais estudado é o de oxidação radicalar não enzimática, mas a lipoperoxidação pode ser iniciada por diversos fatores: enzimas (lipooxigenases e ciclooxigenases), espécies reativas, íons metálicos, radiação UV, calor, etc (Gueraud *et al.* 2010).

A lipoperoxidação ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação ocorre com ataque de um radical livre em um grupo metileno e abstração de um átomo de hidrogênio bis-alílico de um lipídeo. Os fosfolipídeos de membrana que contém ácidos graxos poliinsaturados são mais susceptíveis à lipoperoxidação, pois a abstração de um hidrogênio do grupo metileno deixa para trás um elétron não emparelhado centrado no carbono. A presença de insaturação no ácido graxo enfraquece a ligação C-H, facilitando a abstração de hidrogênio. Diversas espécies reativas conseguem realizar a abstração de hidrogênio tais como os radicais hidroxila, peroxila e alcoxila. A molécula sofre um rearranjo onde um radical centrado no carbono reage com oxigênio molecular e o que se segue é a formação de um radical peroxila, LOO• (Halliwell *et al.*, 1999).

O radical peroxila, por sua vez, pode abstrair um hidrogênio de um ácido graxo vizinho produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH), propagando a cadeia de lipoperoxidação. Os hidroperóxidos podem sofrer clivagem por meio de reação com íons de metais redutores, como o Fe^{2+} , produzindo radicais alcóxila (LO^\bullet), ou se decompõem via endoperóxidos e em uma série de compostos não radicalares, por isso, mais estáveis e difusíveis pela célula. A terminação da reação de liperoxidação acontece com a geração desses hidropéroxidos lipídicos ou pela aniquilação entre os radicais formados. Por meio, principalmente, de cisão beta e clivagem de Hock são gerados alcanos, aldeídos, cetonas, álcoois, furanos, entre outros (Kneepkens, Lepage e Roy, 1994; Shibamoto, 2006). A figura 3 mostra o processo de lipoperoxidação e alguns de seus produtos.

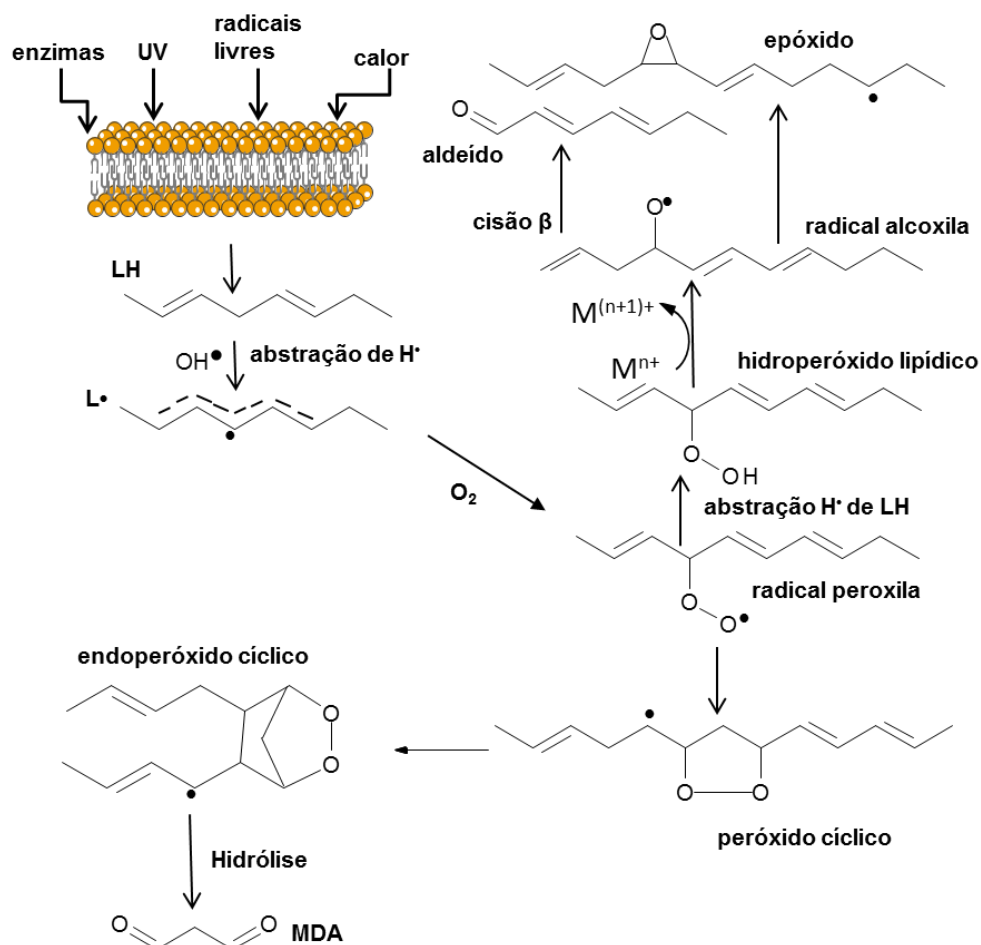


Figura 3. Esquema representativo das reações de iniciação e propagação de peroxidação lipídica, Adaptado de Freitas, 2014.

Em 1978, Esterbauer e Schauenstein inauguraram o campo de estudos em liperoxidação com a hipótese da formação endógena de aldeídos reativos. Eles mostraram que 4-hidroxialquenais formavam ligações estáveis com grupos sulfidril (tioéter) de enzimas e proteínas estruturais, promovendo o bloqueio de alguns processos metabólicos como a síntese de DNA, RNA e proteínas, respiração e glicólise.

Muitas doenças estão relacionadas ao processo de lipoperoxidação, especialmente as neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica. Barbosa *et al.* (2010) verificou um aumento significativo na concentração de malondialdeído (MDA), um importante marcador de lipoperoxidação, em neuroblastomas humanos superexpressando a enzima SOD 1 com mutação G93A, presente em caso de esclerose lateral amiotrófica familiar (ELAf). Muitos estudos, no entanto, demonstram que em níveis baixos, aldeídos formados pela lipoperoxidação contribuem para regulação de diversos processos biológicos e que um balanço delicado existe entre concentrações basais e citotóxicas (Fritz e Petersen, 2013). Dependendo do tipo celular, nível de dano celular, capacidade de reparo e metabolismo celular, em níveis baixos, o 4-HNE pode promover sobrevivência (sinalizando expressão gênica de enzimas antioxidantes e respostas adaptativas); em níveis médios causa danos em proteína e organelas levando a indução de autofagia ou senescência e em níveis altos forma adutos de DNA e conseqüentemente, morte celular por apoptose ou necrose (Ayala *et al.*, 2014).

1.2. Poluição Urbana

Em uma megalópole como São Paulo, a qualidade do ar depende da emissão de poluentes, das condições meteorológicas e geográficas, radiação solar e parâmetros de deposição e dispersão. Com uma população altamente densa, a poluição urbana é um problema de saúde pública importante para ser enfrentado. Entre todas as atividades humanas, a utilização de combustíveis veiculares está intimamente relacionada com a composição de poluentes da atmosfera urbana de várias cidades.

A poluição atmosférica é a mistura de múltiplos poluentes, naturais e antropogênicos, cuja composição varia com o local, o tempo e as condições climáticas. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC – do inglês *International Agency for Research on Cancer*) a classifica como carcinogênica para humanos (IARC grupo 1) baseado em evidências em humanos, em animais experimentais e mecanismos propostos *in vitro* (Loomis *et al.*, 2013). De fato, diversos países já regulamentam e monitoram os níveis de poluentes específicos, a exemplo de material particulado (PM – do inglês *particulate matter*), NO₂, SO₂ e ozônio (Loomis *et al.*, 2013).

Diversos estudos demonstram associação entre produção de adutos de DNA e poluição atmosférica (Singh *et al.*, 2007; Ayi-Fanou *et al.*, 2011). Como exemplo, um estudo europeu demonstrou o aumento de adutos de DNA em humanos expostos a grandes quantidades de ozônio (Peluso *et al.*, 2005), assim como a produção de adutos com aldeídos está associada à exposição

ocupacional a CRT, de fumaça de cigarro e poluição (Eder e Budiawan, 2001; Minko *et al.*, 2009).

Na cidade de São Paulo – SP – Brasil (SP), o PM está associado à incidência e a mortalidade de câncer, como os de pele e de pulmão (Yanagi, De Assuncao e Barrozo, 2012). O PM contém de inúmeros componentes – incluindo ácidos inorgânicos, compostos orgânicos, metais, solo e poeira – e o tamanho de partícula é diretamente ligado ao potencial nocivo (US EPA, 2014). Partículas com diâmetros inferiores a 10 micrômetros atingem os pulmões e a corrente sanguínea (US EPA, 2014). Em 1999, a genotoxicidade de extratos orgânicos de PM coletado do ar de SP, foi analisada e verificou-se ser mais mutagênica a fração rica em cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos (Spinosa De Martinis *et al.*, 1999).

Os mais de 8,7 milhões de veículos de SP (DETRAN-SP, 2016) conferem à cidade uma composição atmosférica peculiar comparada a outras megalópoles. A queima de combustíveis fósseis e etanol geram crotonaldeído, acetaldeído, formaldeído, acroleína, entre outros poluentes (IARC, 1995; IARC, 1999). Sendo aldeídos clássicos indutores de adutos, é esperado que lesões ao DNA mediassem a mutagenicidade observada por Spinosa De Martinis.

Para estabelecer correlações entre os níveis ambientais de uma substância poluente e o risco que eles podem trazer à saúde humana, a abordagem baseada na detecção e quantificação de biomarcadores tem recebido interesse crescente (Paoletti, 1995). Sato *et al.* investigaram a produção de adutos de DNA em ratos expostos ao ar poluído na cidade de Kawasaki no Japão (Sato *et al.*, 2003). Os níveis de adutos em DNA mostraram-se significativamente mais elevados no pulmão dos animais

expostos quando comparados com animais que receberam ar sem poluentes, indicando que medidas de lesão em DNA podem ser úteis para investigar o efeito de poluentes presentes no ar e riscos para a saúde humana. Peluso *et al.*, (2012) encontraram relações entre adutos de DNA aromáticos e o número de alelos de risco para câncer de pulmão em trabalhadores e moradores de Map-Ta-Phut, uma região industrial em Rayong, na Tailândia.

Nosso laboratório, utilizando método de quantificação de adutos de DNA por HPLC acoplado a espectrometria de massas, analisou urinas de doadores da cidade de São João da Boa Vista, com baixos níveis de poluição e os comparou aos níveis de adutos de doadores da cidade de São Paulo, onde os níveis de poluição são altos. Os níveis do aduto de acetaldeído, 1,N²-propanodGuo foram significativamente maiores nos doadores residentes na cidade de São Paulo em relação aos níveis do aduto em moradores da região menos poluída (Garcia *et al.*, 2013).

1.2.1. Aldeídos: Fontes, modificações em DNA e implicações biológicas

Os produtos de degradação de peróxidos lipídicos podem servir como "segundos mensageiros de estresse oxidativo", devido à sua meia-vida prolongada e sua capacidade de difundir a partir do seu local de formação, em comparação com os radicais livres, cujos efeitos são locais, devido à sua vida curta. Esses produtos de degradação, principalmente aldeídos, tais como malonaldeído, hexanal, 4-hidroxinonenal ou acroleína têm recebido muita atenção porque são compostos eletrofílicos muito reativos. Devido à sua reatividade, os produtos de degradação podem produzir modificações

covalentes em macromoléculas tais como DNA, proteínas e lípidios e exercer alguns efeitos biológicos. Eles também servem como biomarcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Aldeídos exógenos, provenientes da poluição do ar, da alimentação, ingestão de álcool ou tabagismo também podem interagir com biomoléculas e formar adutos.

Sabe-se que a fumaça de cigarro de tabaco é uma mistura complexa de agentes químicos, sendo mais de 100 destes, comprovadamente carcinogênicos. Além dos conhecidos PAH's e aminas aromáticas, compostos inorgânicos, catecóis e aldeídos também desempenham papel muito importante por estarem presentes em maiores concentrações no cigarro de tabaco e no de cannabis (Manicka *et al.*, 2012). O acetaldeído é o composto carbonílico presente em alta concentração no cigarro de tabaco (1110-2101 µg/cigarro), (Fujioka e Shibamoto, 2006). Outros aldeídos presentes no cigarro também são reconhecidamente mutagênicos, como o formaldeído, o crotonaldeído, o malonaldeído e a acroleína.

Paralelamente, encontram-se na fumaça de cigarro de cannabis mais de 60 tipos de canabinóides diferentes, apesar de seu poder mutagênico não ser bem estabelecido devido ao pequeno número de estudos a seu respeito. Devido a sua baixa combustibilidade, a fumaça de cannabis contém cerca de 50% a mais de compostos policíclicos aromáticos carcinogênicos do que a do tabaco (Matsuda *et al.*, 1999).

A análise da reação de aldeídos reativos com nucleosídeos ou DNA intacto revelam que aldeídos α,β -insaturados como o 4-hidróxinonal, acroleína e crotonaldeído, levam à formação de propanos cíclicos substituídos enquanto que aldeídos epoxidados insaturados geram eteno ou etano-cíclicos

(Blair, 2008; Medeiros, 2009). A figura 4 apresenta adutos de DNA que são formados pela reação de alguns produtos de lipoperoxidação e os nucleosídeos 2'-desoxiguanosina, 2'-desoadenosina e 2'-desocitidina.

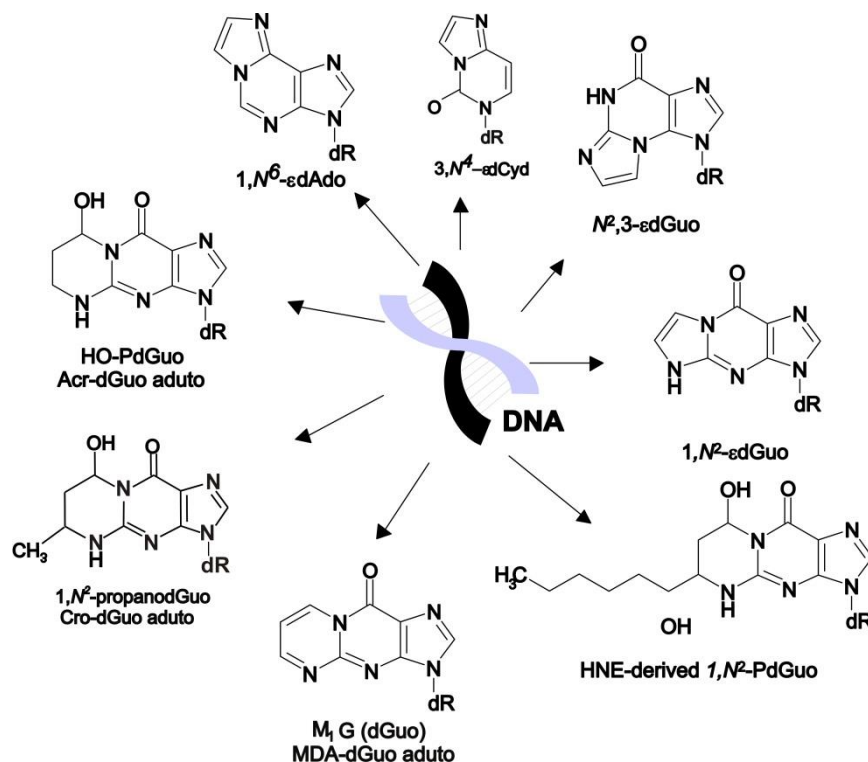


Figura 4. Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação. Por Medeiros, 2009.

Os aldeídos podem ser detoxificados por uma combinação de reações enzimáticas e não-enzimáticas. As principais vias enzimáticas de destoxificação do aldeído são a oxidação por aldeído desidrogenases, redução por aldo-ceto reductases e conjugação com glutationa (catalisada por glutationa-S-transferases). As vias não enzimáticas incluem conjugação com nucleófilos celulares de sulfidrilo e amina, tais como glutationa e carnosina (Xie *et al.*, 2013). Aldeídos saturados sem grupos funcionais secundários são prioritariamente oxidados a ácido carboxílico por ação das enzimas aldeído desidrogenases e citocromo P450.

A principal via de detoxificação de aldeídos α,β -insaturados, em especial hidroxi e oxoalcenais, é a conjugação com GSH (Blair, 2010). Neste processo a dupla ligação é reduzida pela formação de ligação entre o carbono β e o enxofre da GSH. Outros peptídeos importantes na detoxificação de aldeídos são os dipeptídeos: carnosina (β -alanil-L-histidina), homocarnosina, (γ -amino-butiril-histidina) e anserina (β -alanil-L-1-methylhistidina) encontrada em grandes concentrações em músculo esquelético e sistema nervoso central. Alguns adutos conjugados de carnosina com aldeídos foram identificados e nosso laboratório caracterizou, identificou e quantificou o aduto formado entre carnosina e acroleína em amostras urina de humanas utilizando método de HPLC acoplado à espectrometria de massas (Bispo *et al.*, 2015).

1.2.1.1. Formaldeído

O formaldeído é um poluente atmosférico de fontes diversas. Pode ser originado de emissões de exaustão veiculares, plantas, fontes naturais de combustão, fumaça de cigarro e até em frutas contaminadas (Suh *et al.*, 2000). A utilização de formaldeído para vias de produção de outros produtos como resinas, tintas, produtos de limpeza, papéis, entre muitos outros, além de sua utilização em limpeza de hospitais, histopatologia e no embalsamento de tecidos em laboratórios, constituem as principais fontes de exposição ocupacional ao formaldeído. (IARC, 2004). Korky *et al.* (1987) estudou as instalações de dissecação em uma Universidade nos Estados Unidos no período de um ano acadêmico. As concentrações de formaldeído encontradas no ar dos laboratórios foi de 7 a 16,5 ppm e de 1,97 a 2,62 ppm na sala de

estoque. Maître *et al.* (2002) avaliou exposições atmosféricas de poluentes gasosos e particulados em um grupo de policiais que trabalham próximos ao tráfego de carros no centro de Grenoble, na França. A concentração média encontrada nas amostras para formaldeído foi de $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no verão e $21 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no inverno.

Endogenamente, o formaldeído está presente em vários tecidos e em alta quantidade, cerca de $100 \mu\text{M}$ no plasma humano. Pode ser formado no metabolismo de alguns aminoácidos e no metabolismo do metanol, gerando o “one carbon pool”, destinado a biossíntese de ácidos nucleicos e outros intermediários (Neuberger, 1981). Nas células, a maior parte do formaldeído é incorporado pelo peptídeo glutationa, formando a S-hidroximetilglutaciona, que sofre a ação da enzima aldeído desidrogenase 3 (ADH3) resultando na S-formilglutaciona. A glutaciona é restaurada por uma hidrolase específica, liberando formato.

Sabe-se que o aldeído induz *cross-links* entre proteínas e DNA e em DNA de epitélio nasal de ratos (Casanova-Schmitz e Heck, 1983). Ensaios *in vitro* demonstraram a formação da *N*⁶-hidroxi-metil desoxiguanosina (*N*⁶-HO-medA) como um monoaduto de DNA com formaldeído (McGhee e von Hippel, 1975; Zhong e Hee, 2004).

O aduto de adição do formaldeído com a 2'-desoxiguanosina, a 1,*N*²-hidroxi-metil-desoxiguanosina (1,*N*²-HO-metilGuo) também é um importante biomarcador de exposição ao formaldeído. Os níveis basais do aduto foram quantificados em vários tecidos de ratos e foram encontrados entre 1 a 7 adutos por 10^7 moléculas de 2'-desoxiguanosina não modificada (Lu *et al.*, 2010). Ratos expostos a inalação de baixas concentrações (10 ppm) do aldeído

isotopicamente marcado durante seis horas mostraram a formação aduto isotopicamente marcado em tecido de epitélio nasal (Lu *et al.*, 2010).

Os adutos de formaldeído são considerados pró-mutagênicos e produzem inserções, deleções e mutações pontuais GC → TA (Crosby *et al.*, 1988).

1.2.1.2. Acetaldeído

O acetaldeído é um aldeído genotóxico presente na fumaça do tabaco, escape de veículos e vários produtos alimentares. Endogenamente, o acetaldeído é produzido pela oxidação metabólica do etanol pela enzima álcool desidrogenase hepática dependente de NAD⁺ e durante o catabolismo da treonina. A formação de adutos de DNA tem sido considerada um fator crítico nos mecanismos de mutagenicidade e carcinogênese de acetaldeído. Estudos mostraram que o acetaldeído induz a mutação (transição G → A e transversão G → T), troca de cromátides irmãs, micronúcleos, aneuploidia em células de mamíferos em cultura, mutações genéticas em bactérias e câncer no trato respiratório de ratos e hamsters expostos por inalação (IARC 1985, IARC 1999). Estes efeitos mutagênicos e carcinogênicos são promovidos pela elevada reatividade do aldeído, tal como o ataque eletrofílico com grupos nucleofílicos (aminas e sulfidrilas) em proteínas para formar adutos (Nicholls *et al.*, 1992, Niemela, 1993, Worrall *et al.*, 1993). Além disso, este aldeído pode reagir covalentemente com bases nitrogenadas para formar adutos de DNA. Um dos adutos de DNA que são formados pelo acetaldeído é 1,N²-etilideno-2'-desoxiguanosina (1,N²-etilideno-dGuo), (Wang *et al.*, 2000). Esta lesão foi

detectada em animais e humanos e pode estar envolvida na formação de câncer associada à ingestão de álcool (Wang *et al.*, 2006).

A adição de mais uma molécula no aduto de 1,*N*²-etilideno-dGuo por meio de base de Schiff resultante conduz à formação dois diastereoisômeros (6S, 8S) e (6R, 8R) de 1,*N*²-propanodGuo. A formação do aduto de propano derivado pela formação de acetaldeído é catalisada por histonas e poliaminas (Sako *et al.*, 2003), aumentando a sua relevância biológica. O 1,*N*²-propanodGuo formado no DNA está em equilíbrio entre as formas aberta e fechada (Cho *et al.*, 2006). A forma aberta pode conduzir à formação de ligações cruzadas entre fitas de DNA (Minko *et al.*, 2009).

O 1,*N*²-propanodGuo também pode ser formado por crotonaldeído (CRO) (Wang *et al.*, 2000; Hecht *et al.*, 2001). O crotonaldeído é um importante aldeído presente como um poluente químico industrial e ambiental que se forma durante a combustão de materiais vegetais, incluindo o tabaco, e está presente nas emissões de fontes móveis e pode ser gerado endogenamente pela lipoperoxidação.

De acordo com o relatório sobre a qualidade do ar no estado de São Paulo realizado pela CETESB (2015), as concentrações de acetaldeído na atmosfera da região oeste (Estação Pinheiros) apresentaram média de 3 ppb com máxima diária de 9 ppb, durante o ano de 2014.

1.2.1.3. Acroleína

A acroleína possui inúmeras fontes, endógenas e exógenas. É um produto de lipoperoxidação e do metabolismo de aminoácidos como a treonina e a

metionina. Está presente na dieta, no cigarro, na combustão de biodiesel e de matéria orgânica, além de inúmeras outras fontes ambientais.

Este aldeído é mutagênico em bactéria (Marnett *et al*, 1985) e em células humanas (Yang *et al*, 2002). Possui metabolismo mediado pela glutathione. Seu intermediário pode sofrer ação da aldeído-desidrogenase ou da alfa-ceto-redutase, originando dois metabólitos principais, que podem ser encontrados na urina, o ácido carboxietilmercaptúrico e o ácido 3-hidróxi-etilmercaptúrico, respectivamente (Stevens *et al*, 2008).

A acroleína é um aldeído α,β -insaturado, altamente reativo. Reage com nucleosídeos como a 2'-desoxiguanosina formando propano adutos cíclicos como a α -hidróxi-propanodGuo (α -HO-propanodGuo) ou a γ -hidróxi-propanodGuo (γ -HO-propanodGuo), dependendo da direção inicial da adição de Michael (Chung *et al*, 1984). Zhang *et al* (2007) detectou a presença desses adutos no pulmão de fumantes e ex-fumantes, correlacionando seus resultados à formação de mutações em *p53* de pulmões humanos (Yang, 2002). A acroleína também reage com os grupos sulfidrilas da cisteína, com o grupo imidazol da cisteína e com o grupo amino da lisina, formando adutos de adição de Michael ou cross links de bases de Schiff. Além disso, produz outros efeitos tóxicos como disrupção mitocondrial, danos à membrana, estresse do retículo endoplasmático e disfunção imune (Moghe *et al.*, 2015).

1.2.2. Níveis e métodos de detecção

Os métodos de detecção e quantificação de adutos de DNA e outros biomarcadores incluem espectrometria de massas, imunohistoquímica, outros

imuno ensaios e o ^{32}P -*postlabelling*. Os ensaios de imunohistoquímica utilizam antígenos que reconhecem os adutos de DNA e anticorpos que permitem sua visualização no núcleo celular, mas apresentam baixa seletividade entre adutos de estrutura parecida. A técnica de *postlabelling* necessita de poucos microgramas de DNA, que após digestão sofre adição de fosfato isotópico aos nucleotídeos que podem posteriormente ser separados por qualquer técnica cromatográfica. A contrapartida é que a técnica não fornece informação estrutural sobre os adutos. Por isso, a espectrometria de massas, apesar do alto custo, possibilita a maior sensibilidade e seletividade para o estudo de biomarcadores específicos de exposição. Garcia *et al* (2010) desenvolveram um método ultrasensível para a quantificação simultânea dos adutos de acetaldeído e crotonaldeído, o 1,*N*²-propanodGuo, além de 1,*N*²-etenodGuo por cromatografia líquida acoplada à ionização por espectrometria de massas.

Novas estratégias para o estudo de biomarcadores incluem o adutoma, ou seja, a totalidade de adutos em uma amostra resultante da interação entre diferentes eletrófilos a um determinado alvo nucleofílico. Essa nova abordagem permite um estudo mais abrangente do perfil de adutos de DNA, na susceptibilidade de determinados tecidos à exposição de poluentes, a doenças e risco de câncer e o papel desses adutos na etiologia dessas doenças (Rappaport *et al*, 2012).

Kanaly (2006) utilizou a metodologia de cromatografia líquida acoplada à ionização por eletrospray e espectrometria de massas, para quantificar por SRM (*selected reaction monitoring*) transições de perda da 2'-desoxiribose em adutos de 2'-desoxiribonucleosídeos em pulmões de fumantes e não fumantes. A análise gerou um perfil de adutos, mostrado na Figura 5. O perfil do adutoma

sugere regiões entre os dois grupos analisados de adutos formados endogenamente por ambos e aumento de até 4,8 vezes no grupo de fumantes, além da presença de adutos específicos ao grupo exposto à fumaça de cigarro.

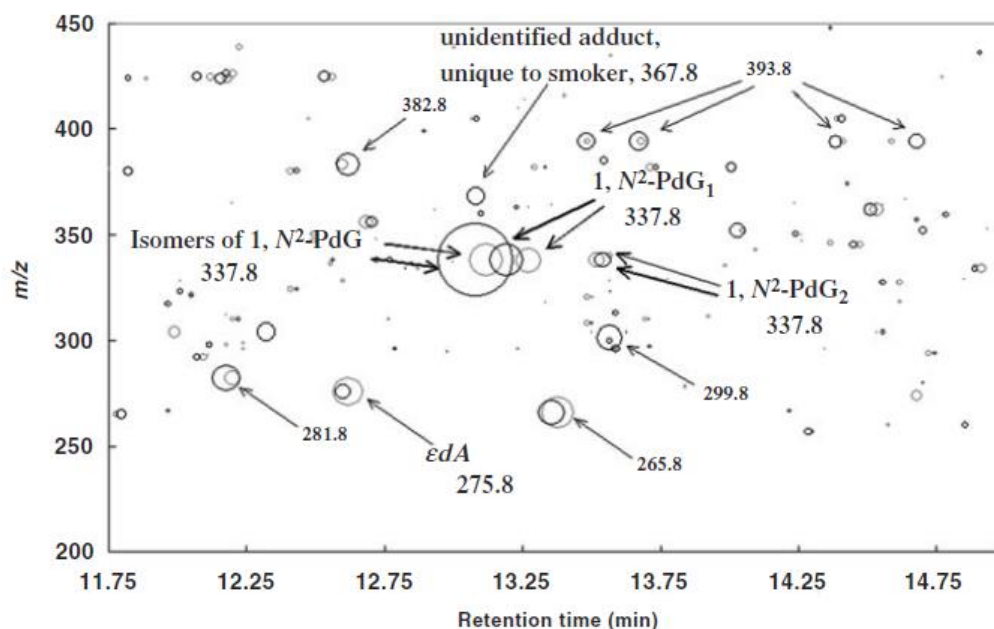


Figura 5. Adutoma de pulmões de fumantes (círculo escuro) e não fumantes (círculo claro). Por Kanaly et al (2006).

Como as concentrações típicas de adutos de DNA em amostras biológicas estão entre 0,01-10 adutos por 10^8 nucleotídeos normais, são necessárias metodologias ultrasensíveis para a sua análise. Os desenvolvimentos recentes em separações analíticas biológicas e espectrometria de massas, especialmente o HPLC de nanofluxo, a ionização por nanospray, o chip MS e o MS de alta resolução (nanoLC-nanoESI-HRMS³) têm empurrado os limites de detecção das metodologias de adutos de DNA (Tretyakova *et al.*, 2012).

1.3. Reparo de DNA

Da mesma forma que existem diversos tipos de lesões em DNA, existem também diversos mecanismos complexos de reparo dessas lesões. Tanto organismos procarióticos quanto eucarióticos possuem processos de reparo do DNA e muitas das proteínas envolvidas foram altamente conservadas ao longo da evolução, mostrando a importância desse processo. Na verdade, as células desenvolveram uma série de mecanismos para detectar e reparar os vários tipos de danos que podem ocorrer ao DNA, independente se o dano é causado pelo ambiente, por processos endógenos ou por erros na replicação (Clancy, 2008).

Pequenas modificações como lesões oxidativas, produtos de alquilação e quebra de fita simples são reparadas pelo mecanismo de reparo de excisão de bases (BER). No BER, as bases danificadas são primeiramente removidas por glicosilases específicas. Em eucariotos, lesões como a 8-oxodGuo são removidas pela 8-oxoguanina-DNA-glicosilase (OGG1) (Radicella et al., 1997) e eteno adutos por alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase (APNG) ou uracila-DNA-glicosilase (UDG) (Singer e Hang, 1999). A remoção das bases formam sítios abásicos, que são preenchidos com novos nucleotídeos por ação de polimerases e a fita é recomposta por DNA ligases (David *et al.*, 2007).

Algumas das lesões de fita simples mais volumosas que distorcem a estrutura helicoidal do DNA, tais como aquelas causadas pela luz ultravioleta e os propano adutos são processadas por reparo de excisão de nucleotídeos (NER) (Clever *et al.*, 2009). O NER é frequentemente subclassificado em reparo acoplado à transcrição (TCR), que ocorre onde a lesão bloqueia a transcrição e

é detectada por alongamento da RNA polimerase, e o reparo do genoma global (GGR), no qual a lesão é detectada não como parte de um processo de transcrição bloqueado, mas porque interrompe o emparelhamento de bases e distorce a hélice do DNA. Embora estes processos detectem lesões utilizando diferentes mecanismos, eles os reparam de forma semelhante ao BER: o DNA envolvendo a lesão é excisado e então substituído usando a maquinaria de replicação de DNA normal (Lord e Asworth, 2012).

Os principais mecanismos que lidam com as quebras de fita dupla do DNA (DSBs) são a recombinação homóloga (HR) (Moynahan e Jasin, 2010) e a união terminal não homóloga (NHEJ) (Lieber, 2010). A recombinação homóloga atua principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular e é um processo conservativo, na medida em que tende a restaurar a sequência de DNA original para o local do dano. Parte da sequência de DNA em torno do DSB é removida e a sequência de DNA de uma cromátide irmã homóloga é utilizada como molde para a síntese de novo DNA. Em contraste com a recombinação homóloga, NHEJ ocorre durante todo o ciclo celular. Ao invés de usar uma sequência de DNA homóloga para guiar o reparo do DNA, NHEJ mede o reparo ligando diretamente as extremidades de um DSB em conjunto. Às vezes, este processo pode causar a deleção ou mutação de seqüências de DNA ao redor do local DSB. Portanto, em comparação com a recombinação homóloga, NHEJ, embora mecanisticamente mais simples, muitas vezes pode ser mutagênico.

A maior parte das doenças relacionadas com o mau desempenho ou ausência de algum mecanismo de reparo de DNA são letais, como a

Xeroderma Pigmentosa e a Síndrome de Cockayne, ambas causadas por mutações em enzimas de reparo por excisão de nucleotídeos.

A anemia de Fanconi (AF) é uma rara doença recessiva descrita em 1927 pelo clínico Guido Fanconi (Lobitz e Velleuer, 2006), e classificada pela Organização Mundial de Saúde como anemia aplásica constitucional (D61.0). Os indivíduos com anemia Fanconi exibem defeitos de desenvolvimento, insuficiência medular óssea e uma forte predisposição ao câncer. Mutações em genes que codificam proteínas que atuam no reparo de ligações cruzadas interfitas do DNA – via de AF (Auerbach, 2009) como a FANCL e SLX4 estão relacionadas à doença, fazendo com que células de pacientes com anemia Fanconi sejam suscetíveis a danos de DNA, especialmente *cross-links* (Patel e Joeje, 2007). Alguns desses genes são especificamente requeridos na resistência celular ao acetaldeído. O grupo de Patel mostrou que células defeituosas para o gene da proteína FANCL são mais sensíveis a acetaldeído exógeno e ratos duplo mutantes para as vias de aldeído desidrogenase 2 e de FANCL são altamente sensíveis à exposição ao acetaldeído. (Langevin et al, 2011). Mutações no gene da proteína *SLX4* causam um subtipo de AF, FANCP (Kim et al., 2011; Stoepker et al., 2011).

2. OBJETIVOS

Os adutos de DNA representam um evento chave nos mecanismos de mutagênese e carcinogênese. Muitas lesões em DNA podem resultar em mutações se a replicação do DNA ocorrer antes do reparo. No entanto, alguns adutos de DNA foram detectados em DNA celular de tecidos animais e humanos sem exposição às substâncias que modificam o DNA. O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologias ultrasensíveis utilizando técnicas de HPLC e espectrometria de massas para detectar e quantificar alguns adutos de DNA formados por aldeídos de interesse ambiental simultaneamente e verificar a formação desses adutos em situações onde, provavelmente, ocorre o aumento de concentração de aldeídos.

Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia sensível de avaliação e quantificação de adutos de aldeídos e 2'-desoxiguanosina baseada em HPLC acoplado a espectrometria de massas;
- Validar a metodologia em modelos de exposição ambientais *in vitro* como exposição de DNA de timo de bezerro à fumaça dos cigarros de tabaco e Cannabis e exposição de células modelo para Anemia e Fanconi ao acetaldeído, além de modelos *in vivo*, como ratos modelo para doença Esclerose Lateral Amiotrófica.
- Estudar a formação do aduto de acetaldeído 1,N²-propanodGuo em ratos expostos à acetaldeído exógeno (isotopicamente marcado) por inalação e confirmar estruturalmente a formação dos mesmos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA). Os solventes: diclorometano, etanol, metanol, isopropanol e acetonitrila grau HPLC e MS foram obtidos de J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ) ou Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico, acetato de amônio e formiato de amônio grau MS foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). [$^{15}\text{N}_5$]-2'-desoxiguanosina, [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodGuo e [$^{13}\text{C}_2$]-acetaldeído foram fornecidos por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). EDTA, Tris-Triton-X100, cloreto de sódio, proteinase K, ribonucleases A e T1, nucleasse P1, fosfatase alcalina, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecilsulfato de sódio (SDS) e mesilato de desferroxamina utilizados são da Sigma (St. Louis, MO). Fosfato de potássio, cloreto de magnésio, agarose e sacarose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Soro fetal bovino foi obtido da Atena Biotecnologia (Campinas, SP) e meio de cultura da Sigma (St. Louis, MO). Os demais reagentes citados na metodologia eram do maior grau de pureza disponível no mercado.

3.2. Equipamentos

Foram utilizados centrífuga modelo 5804 R com rotor de ângulo fixo F-45-30-11, thermomixer R, thermomixer Comfort (Hamburg, Alemanha). As soluções para cultura celular 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 (Corning, NY). As incubações em banho-maria foram feitas em banho modelo 144 da Fanem (São Paulo, Brasil). As células foram incubadas em estufa de gás carbônico Napco®, modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, Illinois). Foram utilizadas balança analítica da A&D Company (Tokyo, Japão) e balança APX 602 da Dencer Instrument (Göttingen, Alemanha). O liofilizador e o concentrador utilizados foram, respectivamente, FreeZone 2.5 Plus e Refrigerated CentriVap Concentrator (Labconco, Kansas City, MO). Os demais equipamentos utilizados serão descritos na metodologia.

3.3. Síntese, purificação e caracterização dos padrões de adutos de DNA

Para confirmação estrutural dos adutos, espectros de massas foram realizados utilizando um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo QTRAP-6500 (Sciex, Framingham, MA) com fonte *electrospray* (ESI) no modo positivo, utilizando os produtos purificados para infusão direta.

3.3.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo

A síntese foi realizada em três etapas, sendo a 8-bromo-2'-desoxiguanosina produto intermediário para a síntese de 8-benziloxi-2'-desoxiguanosina que por sua vez é convertida em 8-oxodGuo. O produto foi purificado em HPLC em gradiente de MeOH e água como descrito por (Lin *et al.*, 1985).

3.3.2. Síntese e purificação de 1,N²-εdGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo

O padrão não-marcado de 1,N²-εdGuo e o padrão isotopicamente marcado [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo foram obtidos reagindo 2'-desoxiguanosina e [¹⁵N₅]-dGuo, respectivamente, com cloroacetaldeído. A uma solução de 0,04 nmol de dGuo em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,4, foi adicionado 0,6 mmol de cloroacetaldeído. Posteriormente, a solução foi incubada a 37°C por 96 h e os adutos foram purificados por cromatografia líquida como descrito por Loureiro *et al.* (Loureiro, *et al.*, 2000).

3.3.3. Síntese e purificação de 1,N²-propanodGuo, [¹³C₄]-1,N²-propanodGuo e [¹³C₄,¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo

O padrão não marcado 1,N²-propanodGuo, o aduto formado com duas moléculas de acetaldeído isotopicamente marcado [¹³C₄]-1,N²-propanodGuo e o padrão isotopicamente marcado com nitrogênio e carbono [¹³C₄,¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo foram sintetizados reagindo-se 25 μmol de 2'-desoxiguanosina e [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina, respectivamente, com 50 μL de acetaldeído

isotopicamente marcado ou não, em presença de 0,05 mmol de lisina como descrito por Garcia *et al* (2011). Os isômeros R e S dos produtos foram purificados por um sistema de HPLC Shimadzu com detector Diode Array SPD-MA10A com coluna semi-preparativa Luna C18(2), 250 x 10,0 mm i.d., 10 µm utilizando um sistema binário de água e metanol, em gradiente de 2% a 30% de metanol em 30 min, com fluxo de 4 mL/min e monitorado em 254 nm.

3.3.4. Síntese e purificação de 1,N²-HO-propanodGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-HO-propanodGuo

Uma solução contendo 10 mM de 2'-desoxiguanosina ou [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina e 100 mM de acroleína em tampão fosfato (pH=7,4) 100 mM foi incubada por 24 h a 37°C e sob agitação de 500 rpm. Os isômeros α e γ de 1,N²-HO-propanodGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-HO-propanodGuo foram separados por HPLC Shimadzu com detector *Diode Array* SPD-MA10A com coluna semi-preparativa Luna C18(2), 250 x 10,0 mm i.d., 10 µm em um sistema binário de solução de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila, em gradiente de 5% a 40% por 40 min, com fluxo de 4 mL/min e monitorado em 257 nm.

3.3.5. Síntese, purificação e caracterização de 1,N²-HO-medGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-HO-medGuo

Uma solução contendo 10 mM de 2'-desoxiguanosina ou [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina e 100 mM de formaldeído em 100 mM de tampão fosfato (pH=7,0) foi incubada *overnight* a 37°C e 400 rpm. Os produtos foram purificados pelo mesmo método descrito em 3.3.3.

3.4. Desenvolvimento da metodologia para quantificação dos adutos de DNA por HPLC-ESI⁺-MS/MS

Para a separação dos adutos foi utilizado um sistema 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 30 °C e o software Analyst 1.6. Foram empregados todos os padrões internos dos adutos utilizando 2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada [¹⁵N₅]. Os adutos de DNA foram, inicialmente, separados em coluna analítica Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA), de acordo com o método gradiente de água e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Gradiente de ácido fórmico 0,1% em solução aquosa e acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção dos adutos de DNA:

| Tempo (min) | %B (MeCN) | Fluxo (µL/min) |
|-------------|-----------|----------------|
| 0 | 10 | 500 |
| 10 | 10 | 250 |
| 15 | 40 | 250 |
| 40 | 30 | 250 |
| 41 | 60 | 500 |
| 45 | 40 | 500 |
| 46 | 90 | 500 |
| 50 | 90 | 500 |

Uma segunda bomba Agilent 1200 *Isocratic Pump* SL foi usada para alimentar uma segunda coluna Luna C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 µm com fluxo isocrático de 250 µL/min e uma solução de 20% de 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: aos 20 min, 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 aos 40 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna. O tempo total desta análise é de 50 min.

Os adutos foram analisados com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 6500 Q-TRAP sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap. As transições escolhidas para os íons estão dispostas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Transições escolhidas para os adutos de DNA e os respectivos padrões internos analisados por HPLC-ESI⁺-MS/MS.

| Aduto | Transições [M+H] ⁺ | Padrão Interno | Transições [M+H] ⁺ |
|----------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|
| 1,N ² -HO-MedGuo | 298.100 → 181.900 | 1,N ² - [¹⁵ N ₅]-HO-MedGuo | 303.100 → 169.000 |
| | 298.100 → 164.000 | | 303.100 → 187.000 |
| 8-oxodGuo | 284.100 → 167.900 | [¹⁵ N ₅]-8-oxodGuo | 289.100 → 172.900 |
| | 284.100 → 140.000 | | 289.100 → 145.000 |
| 1,N ² -HO-propanodGuo | 324.100 → 208.000 | [¹⁵ N ₅]- 1,N ² -HO-propanodGuo | 329.100 → 213.000 |
| | 324.100 → 189.900 | | 329.100 → 194.900 |
| 1,N ² -εdGuo | 292.100 → 176.000 | [¹⁵ N ₅]-1,N ² -εdGuo | 297.100 → 181.100 |
| | 292.100 → 121.000 | | 297.100 → 153.000 |
| 1,N ² -propanodGuo | 338.100 → 222.000 | [¹⁵ N ₅]-1,N ² -propanodGuo | 343.100 → 227.000 |
| | 338.100 → 178.000 | | 343.100 → 183.000 |

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição [M+H]⁺ → [M+H-2-D-erythro-pentose]⁺ como transição de maior intensidade e portanto, de quantificação, além de uma

segunda ou terceira transição para confirmação estrutural, sendo que a curtain gas foi de 20 psi, temperatura 550 °C, gás de nebulização e gás auxiliar 40 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray +5500 V, gás de colisão alto, aquecimento da Interface Heater ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V.

3.4.1. Estudo de formação dos adutos em DNA de timo de bezerro expostos a extratos de fumaça de cigarro de nicotina ou cigarro de Cannabis sativa

3.4.1.1. Preparação dos extratos dos cigarros de tabaco e cannabis

Alíquotas de 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 foram expostas à fumaça de 10 cigarros de tabaco comercial e 10 cigarros de Cannabis (contendo massa de cannabis igual à massa de tabaco encontrada em cigarros de tabaco), à temperatura ambiente através de um simples aparato similar ao usado por Leanderson e Tagesson, 1990, mostrado na Figura 3.1. Após a exposição, o tampão foi utilizado imediatamente ou estocado a -20°C. Foram realizadas 3 preparações de extratos para cada tipo de cigarro.

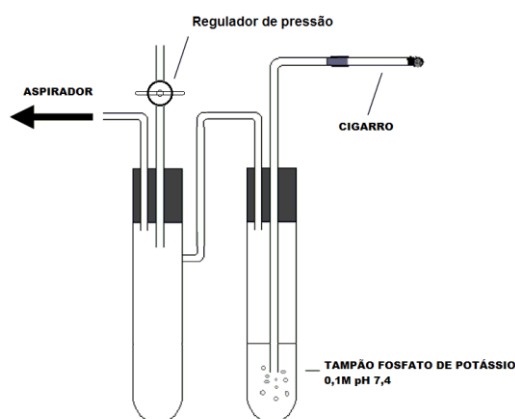


Figura 6. Diagrama do aparato usado para coleta do extrato da fumaça de cigarro e do cigarro de cannabis.

3.4.1.2. Incubação de DNA de timo de bezerro com os extratos de cigarro de tabaco e cannabis

Três soluções de 0,1 mg/mL de DNA de timo de bezerro dissolvido em tampão fosfato foram preparadas e suas concentrações foram confirmadas através da determinação de sua absorvância em 254 nm, assumindo que cada unidade de absorvância equivale a 50 µg/mL. Além disto, a pureza do DNA foi medida através da razão 260/280 nm, para a qual o valor foi acima de 1,8 para ambas as soluções. 400 µL das soluções de DNA foram incubadas com 600 µL dos extratos dos cigarros de tabaco e cannabis por 48 h a 37°C a 350 rpm.

3.4.1.3. Precipitação e Hidrólise do DNA

Após a incubação, a amostra de DNA foi precipitada com a adição de 1,0 mL de NaI 7,6 M, 1 mL de 0,3 mM de desferroxiamina e 4,0 mL de isopropanol gelado, seguida de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 4,0 mL de isopropanol a 60% gelado e mais uma etapa de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi seco e ressuspendido em 100 µL de desferroxiamina.

Para a hidrólise de DNA, 100 µL de solução de DNA foi incubado com 6 µL de acetato de sódio 1 M e 3 U de Nuclease P1 por 30 minutos a 37°C e 400 rpm e incubado novamente por 1 hora com 12 µL de Tris-HCl 1,0 M e 9 U de fosfatase alcalina a 37°C e 400 rpm. Antes de iniciar essa etapa, foram adicionados 250 fmol dos padrões internos de cada um dos adutos de DNA.

3.4.1.4. Quantificação dos adutos de DNA encontrados na reação entre o extrato dos cigarros de tabaco e cannabis e o DNA de timo de bezerro

Para quantificação dos adutos de DNA, 100 µL de amostra foram injetados no sistema de HPLC-ESI⁺-MS/MS utilizando a metodologia descrita em 3.4.

3.4.2. Estudo de formação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi.

3.4.2.1. Cultura celular

Para realizar a análise de adutos de DNA em modelo *in vitro*, foram escolhidas células de fibroblastos embrionários de camundongos selvagem (MEF WT) ou deficiente em SLX4 (MEF Slx4^{-/-}), que foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. K.J. Patel (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK).

As células MEF foram mantidas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de PenStrep (Gibco, 10.000 unidades de penicilina e 10.000 µg de estreptomicina × mL⁻¹) (Crossan et al., 2011). Os meios foram esterilizados por filtração (0,22 µm, TPP, Suíça). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂ e mantidas em confluências entre 20 – 80%.

3.4.2.2. Tratamento de células MEF com acetaldeído

As células (2 × 10⁶ células × 150 cm²) foram tratadas 2 mM de acetaldeído ou sem acetaldeído (grupo controle). A concentração de aldeído foi estipulada por meio de ensaios de viabilidade celular (Freitas, 2014). Após a remoção do

meio, foi adicionado meio fresco a 4°C, com acetaldeído recém-adicionado ao meio, aliqotado em seringa de vidro previamente resfriada. As células foram incubadas por 2 h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após este período as células foram lavadas 2 vezes com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS-A) antes da extração do DNA (conforme item 3.4.2.3.).

3.4.2.3. Extração de DNA

As garrafas contendo as células MEF aderidas foram lavadas com PBS e depois as células foram raspadas e coletadas. Foi adicionado 4 mL de tampão A (sacarose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1% de triton X-100, pH 7,5) e centrifugados a 1500g por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de tampão A e centrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspendido em 2,4 mL de tampão B (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 5 mM, desferroxamina 0,15 mM, pH 8,0) e 75 µL de uma solução de SDS 10%. A esta solução foram adicionados 30 µL de uma solução 10 mg/mL de RNase A (em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0, previamente fervida por 15 min) e 8 µL de uma solução 20 U/ µL de RNase T1 (em tampão Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, desferroxamina 2,5 mM, pH 7,4). A amostra foi incubada a 37°C por 1 h. Em seguida, foram adicionados 60 µL de uma solução de proteinase K 20 mg/mL. Após outra incubação a 37°C por 1 h e centrifugação a 9000 g por 15 min, o sobrenadante foi coletado, adicionou-se 200 µL de solução de iodeto de sódio (NaI 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0,3 mM, pH 8,0) e 8 mL de isopropanol. O tubo foi mantido no freezer (-20°C) por uma noite para precipitação do DNA. O precipitado foi coletado e lavado cuidadosamente com isopropanol 100%,

isopropanol 60% e etanol 70%, nessa ordem. O DNA, depois de seco sob fluxo de N₂, foi ressuscitado em 300 µL de desferroxamina 0,1 mM. A concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, maior que 1,7.

3.4.2.4. Hidrólise do DNA

A 150 µg de DNA foram adicionados 3 µL de tampão acetato de sódio (3,0 M, pH 5,0), 9 µL de nuclease P1 (0,4 U/µL) e 15 µL de uma solução contendo todos os padrões internos dos adutos utilizando 2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada [¹⁵N₅] (10 fmol/µL de cada). A mistura foi incubada por 30 min a 37°C no escuro e, em seguida, adicionou-se 3 µL de tampão Tris-HCl (3,0 M, pH 7,4), 9 µL de tampão para fosfatase alcalina e 9 µL de fosfatase alcalina (2 U/µL). Seguiu-se a incubação a 37°C por 1 h (Fiala, Conaway e Mathis, 1989). As amostras foram avolumadas para 150 µl e injetados 100 µL no HPLC-ESI⁺-MS/MS.

3.4.2.5. Quantificação dos adutos de DNA nas células MEF

Para a análise dos adutos de DNA nas células MEF foi utilizado a metodologia descrita no item 3.4. Os resultados foram normalizados pela concentração de 2'-desoxiguanosina não modificada, quantificada em HPLC com detecção no UV em 254 nm.

3.4.3. Quantificação de adutos de DNA em modelo animal de Esclerose Lateral Amiotrófica

Foram utilizados ratos Sprague–Dawley hemizigotos superexpressando a enzima Superóxido Dismutase humana com substituição da glicina 93 por alanina (SOD1^{G93A}), modelo para ELA (NTac:SD-Tg(SOD1G93A)L26H). Estes animais apresentam na medula níveis de SOD1^{G93A} humana oito vezes maiores que os de SOD1 endógena, sendo, porém, expressa em todos os tecidos.

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP.

Os animais foram mantidos na área de experimentação da colônia do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo com controle de ciclo claro/escuro de 12 h, comida e água *ad libitum*.

3.4.3.1. Genotipagem

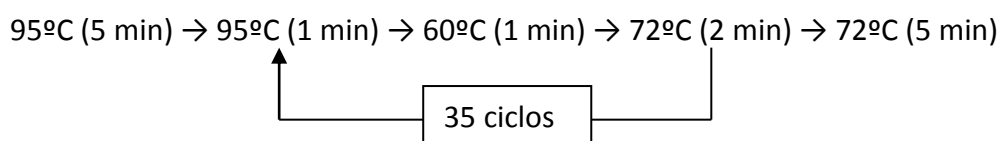
A ponta da orelha dos animais foi cortada e congelada a -80°C. Em seguida, as orelhas foram mergulhadas em 300 µL de tampão de digestão (50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 0,5% SDS) e incubadas a 65°C por 15 min para inativar DNases. Mais uma alíquota de 175 µL de tampão de digestão e 25 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados para digestão das proteínas, durante incubação a 55°C overnight. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 5 min. O sobrenadante foi diluído 20 vezes em água autoclavada e aquecido a 95°C por 15 min. Uma alíquota de 2 µL da amostra diluída foi utilizada para reação de PCR.

Os primers sodi3 (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA) e sodE4 (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA) descritos por Howland *et al.* 2002 foram utilizados no PCR. A reação para cada amostra foi preparada como descrito na tabela abaixo:

Tabela 3.3. Composição do meio de PCR para genotipagem dos ratos SOD1^{G93A}

| Reagente | Volume (µL) | Concentração final |
|--------------------------|-------------|--------------------|
| MgCl ₂ 50 mM | 1,5 | 1,5 mM |
| Tampão 10 X | 5 | 1 X |
| dNTPs 20 mM | 0,5 | 0,2 mM |
| Primer sodi3 20 µM | 1 | 0,4 µM |
| Primer sodE4 20 µM | 1 | 0,4 µM |
| Taq DNA polimerase 2U/µL | 1 | 2 U / 50 µL |
| Amostra diluída | 2 | |
| H ₂ O | 38 | |

Para a reação de PCR utilizou-se um termociclador Mastercyle Gradient da Eppendorf operando o seguinte programa:



Ao fim do PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, com 0,2 mg/mL de brometo de etídio, a 100 V. As amostras que apresentaram uma banda de aproximadamente 200 pb foram consideradas positivas para a presença do gene Sod 1 com a mutação G93A.

3.4.3.2. Avaliação, coleta de órgãos e eutanásia

Os ratos transgênicos SOD1^{G93A} foram pareados com animais irmãos controles para avaliação física motora. Os animais foram pesados a cada dois dias a partir dos 58 dias de idade. A cada quatro dias, além do peso, foram avaliadas as capacidades de ficar suspenso em grade contra a gravidade, de sustentar-se em plano inclinado, de levantar-se apoiando sobre os membros pélvicos, de endireitar o corpo quando colocado em apoio dorsal, de resistir à pressão lateral, e avaliados os movimentos das articulações dos membros pélvicos e torácicos de acordo com Freitas, 2014. Para eutanásia estabelecemos limiar de perda de 15 a 20% do peso máximo do animal.

Para a coleta de órgãos, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (0,56 mL/kg de peso de animal, solução 2%) e ketamina (0,9 mL/kg de peso de animal, solução 10%). Após a verificação da ausência de sentidos e reflexos nos animais, o sangue foi coletado à vácuo por meio de punção cardíaca. Foram então removidos diversos tecidos, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e utilizados imediatamente para análise ou congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises. Nos ensaios de quantificação de adutos de DNA foram utilizados o músculo da pata direita traseira dos ratos.

3.4.3.3. Extração e hidrólise de DNA

Aproximadamente 200 mg de tecido do músculo da pata traseira direita foram homogeneizados em 4 mL de tampão A (sacarose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1% de Triton X-100, pH 7,5) e

centrifugados a 1500 g por 10 min a 4°C. Depois, seguiu-se como descrito da metodologia de extração de DNA em 3.4.2.3. O DNA, depois de seco sob fluxo de N₂, foi ressuspendido em 100 µL de desferroxamina 0,1 mM. A concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, maior que 1,7. O DNA do músculo dos ratos ALS foi hidrolisado de acordo com o método descrito em 3.4.2.4.

3.4.3.4. Quantificação dos adutos de DNA nos animais ALS

Para a análise dos adutos de DNA nos tecidos dos ratos ALS foi utilizada a metodologia descrita no item 3.4. Os resultados foram normalizados pela concentração de 2'-desoxiguanosina não modificada.

3.5. Análise da formação de 1,N²-propanodGuo exógeno em ratos expostos ao acetaldeído isotopicamente marcado por inalação

3.5.1. Tratamento dos ratos *Wistar* com acetaldeído isotopicamente marcado

Quinze ratos machos adultos *Wistar* com 18 semanas foram divididos em três grupos com cinco animais cada, a saber: grupo controle, sem qualquer tratamento e grupos tratados com as concentrações de 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído isotopicamente marcado. Os animais foram pré-condicionados durante 10 dias em caixas especialmente adaptadas em colaboração com o

laboratório do Prof. Dr. Ivano GR Gutz, do Departamento de Química Fundamental, desta instituição.

As caixas foram seladas com borracha especial completamente inerte e tampadas com uma placa de vidro para permitir a entrada de luz e garantir o ciclo claro e escuro. Cada caixa tinha um fluxo constante de gás de 12 litros/min na presença ou ausência de acetaldeído, na concentração necessária para cada experiência (0 ou 10 ppb). O sistema foi equipado com ar sintético e um sistema de alarme, que foram ativados em caso de falha de energia a uma taxa de 2 L / min.

O fluxo de ar foi controlado por uma bomba Ferrari (compressor mega Jet CMJ-130) e um manômetro. O ar foi removido do ambiente, filtrado em um sistema de filtro industrial de carvão ativado e foi adicionado a um fluxo de acetaldeído controlado por uma segunda bomba (figura 3.2).

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP.

Os animais foram mantidos na área de experimentação da colônia do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo com controle de ciclo claro/escuro de 12 h, comida e água *ad libitum*.

No final de 50 dias de tratamento, os ratos controle e os ratos tratados com 0 e 10 ppb de acetaldeído foram anestesiados com 0,9 mL/kg de xilazina (10%) e 0,56 mL/kg de cetamina (2%) para retirada de órgãos (fígado, pulmão e cérebro). Os órgãos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em um congelador a -80 ° C.

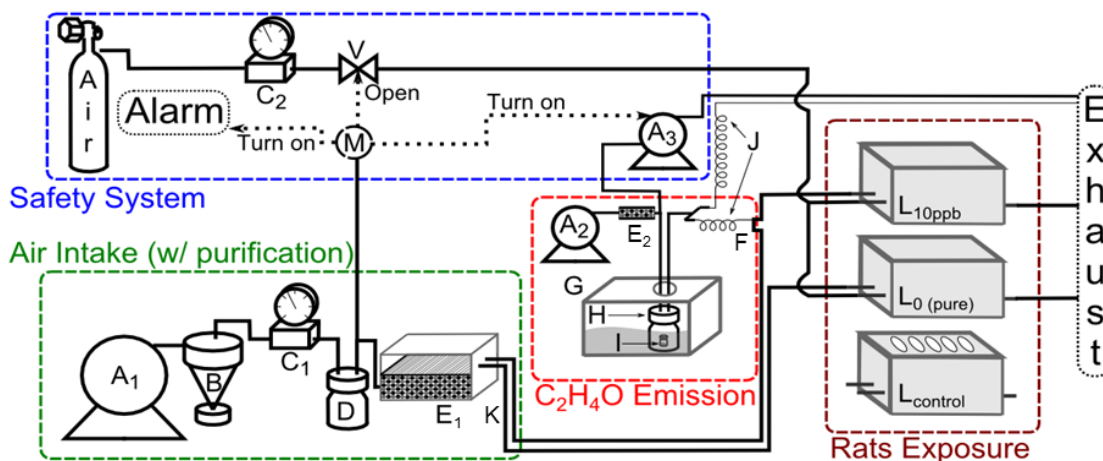


Figura 7. Fig. 1. Sistema para exposição prolongada por inalação de ratos Wistar a [$^{13}\text{C}_2$] acetaldeído. A - bombas de ar de diafragma; B - ciclone para remoção de partículas; C - reguladores de pressão de gás; D - purgador de água / humidificador; E - purificadores de ar (preenchidos com mistura Purafil select) com filtros; F - confluência de mistura de gases; J - resistências hidrodinâmicas do divisor calibrado; K - linhas de ar purificadas com fluxo ajustado para 12 L min⁻¹; Gaiolas em L adaptadas para exposição por inalação de ratos (as gaiolas L0 e L10ppb têm tampas de vidro fechadas); M - detector de queda de pressão; V - válvula de aperto (abre o fornecimento de ar de reserva apenas em caso de uma queda de energia ou falha da bomba). Imagem preparada por Guilherme Lopes Batista.

3.5.2. Extração e hidrólise de DNA

Tubos contendo homogenatos de pulmão e cérebro (1 g de tecido em 6 mL de solução de lise) foram centrifugados a 1500 g durante 10 min e os sedimentos foram respectivamente suspensos em 6 mL de uma solução de lise (1% (p/v) de Triton X-100, 320 mM de sacarose, 5 mM de MgCl_2 e 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Este passo foi repetido duas vezes seguidos de centrifugação a 1500 g durante 10 min. Os pelets foram resuspensos em 6 mL de uma solução 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA e 0,15 mM de desferroxamina. As enzimas de RNase A (150 μL de uma solução a 10 mg/L em 10 mM de Acetato de Sódio pH 5,2, aquecidas durante 15 min a 100°C) e RNase T1 (50 μL de uma solução de 1 U/ μL em 10 mM de Tris-HCl tampão, pH 7,4, contendo EDTA 1 mM e 2,5 mM desferroxamina) foram adicionados em conjunto com 200 μL de uma solução 10 % (p/v) de SDS e a mistura de reação

foi incubada a 37°C durante 1 h. Após este período, 200 µL de proteinase K (20 g/L) foram adicionados aos tecidos, seguindo-se de uma incubação adicional a 37 °C durante 1 h. Após centrifugação a 5000 g durante 15 min, a fase líquida foi recolhida e 500 µL de NaCl 5 M foram adicionados ao sobrenadante, centrifugados a 5000 rpm por 30 min e ao sobrenadante foram adicionados 6 mL de isopropanol gelado. O conteúdo do tubo foi bem misturado por inversão até um precipitado esbranquiçado aparecer. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 5000 g durante 15 min e lavou-se com 1 mL de isopropanol a 60% seguido por 1 mL de etanol a 70%. Após centrifugação adicional a 5000 g durante 15 min e secagem em vácuo, o precipitado de DNA foi solubilizado em solução de 0,1 mM de desferroxamina.

A concentração de DNA foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm e a sua pureza foi avaliada por assegurar uma relação A260 / A280 igual à 1,7.

Para a hidrólise de 1 mg de DNA, 25 µL de tampão de acetato de sódio 1 M pH 5,0 e 10 U de nuclease P1 foram adicionados à amostra que foi incubada a 37°C durante 30 min. Depois, 25 µL de Tris-HCl 1 M pH 7,4 e 25 µL de tampão acetato de potássio 500 mM pH 7, contendo 100 mM de Tris-acetato e 100 mM de acetato de magnésio foram adicionados, seguidos pela adição de 20 µL de fosfatase alcalina. A mistura de reação foi incubada a 37°C durante 1 h. O volume final da amostra foi ajustado para 500 µL com água antes da adição de todos os reagentes e considerando também os seus volumes antes do primeiro período de incubação. As enzimas foram precipitadas pela adição de um volume de clorofórmio imediatamente o final da hidrólise, com a adição de 2,5 fmol de padrão interno [¹³C₂,¹⁵N₅]-1,N^ε-propanodGuo. Após

centrifugação a 12000 g durante 5 min, a amostra foi filtrada em filtro para tubo de centrífuga de PVDF com membrana de 0,1 µm e encaminhada para extração em fase sólida para enriquecimento de lavagem da amostra.

3.5.3. Metodologia de purificação das amostras - Enriquecimento e pré-purificação das amostras por extração em fase sólida (SPE) e HPLC-UV.

As amostras precisaram ser submetidas à processos de enriquecimento e purificação pois, para realizarmos as análises em micro-LC tínhamos que obter uma amostra concentrada e pura, no entanto, não dispomos de válvulas de separação na escala micro, para realizar a separação on line dos nucleosídeos não modificados dos adutos de interesse. Por isso, após inúmeros testes preliminares com diferentes fases de extração, realizou-se a concentração do aduto por metodologia de extração em fase sólida (SPE) utilizando-se, para isso, coluna StrataX (Phenomenex) de 30 mg/mL. Os cartuchos foram condicionados por 5 mL de metanol seguido de 5 mL de água e após adição da amostra, realizou-se uma lavagem com 5 mL das soluções de 0%, 7% e 10% de metanol, respectivamente. Os adutos foram extraídos por 2 mL de uma solução de 25% de metanol, secos e ressuspensos em água para injeção no sistema de MicroLC.

Depois de ressuspensas as amostras foram injetadas para purificação em um sistema de HPLC Prominence Shimadzu constituído por um auto injetor SIL-20 resfriado a 4°C, bombas LC-AT e detector de UV-VIS SPD-20AV, com comprimento de onda fixo em 254 nm. Foi utilizado para separação uma coluna analítica Phenomenex, Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 3 µm e um método

gradiente de água e acetonitrila, descrito na tabela 3.4. Apenas o intervalo entre 22 e 30 min foi coletado para purificação.

Tabela 3.4. Gradiente utilizado para a purificação das amostras por HPLC/UV.

| Tempo (min) | %B (ACN) | Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$) |
|-------------|----------|------------------------------------|
| 0 | 10 | 650 |
| 8 | 10 | 200 |
| 12 | 40 | 200 |
| 20 | 30 | 200 |
| 21 | 60 | 200 |
| 22 | 40 | 200 |
| 26 | 90 | 200 |
| 27 | 90 | 650 |
| 32 | 10 | 650 |
| 35 | 10 | 650 |

3.5.4. Detecção dos adutos endógenos e exógenos de 1,*N*²-propanodGuo por microLC/MS/MS em pulmões e cérebros de ratos tratados com acetaldeído isotopicamente marcado.

Na metodologia desenvolvida e otimizada para a detecção e quantificação do aduto 1,*N*²-propanodGuo foi utilizado um sistema de microLC Eksigent constituído por um autoinjeter CTC/PAL resfriado a 10 °C e forno de coluna a 30 °C e um software Analyst 1.4.2. As amostras foram, inicialmente, separadas em coluna analítica HALO Phenyl Hexyl de 150 mm x 0.5 mm i.d., 2,7 μm (Eksient, Dublin, CA), de acordo com o método gradiente de tampão formiato de amônio 10mM e acetonitrila, descrito na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Gradiente utilizado para a quantificação dos adutos de 1,*N*²-propanodGuo nas amostras por microLC-ESI⁺-MS/MS

| Tempo (min) | %B (Acetonitrila) |
|-------------|-------------------|
| 0,0 | 2 |
| 1,5 | 2 |
| 3,0 | 15 |

| | |
|------|----|
| 3,5 | 15 |
| 3,6 | 95 |
| 5,0 | 95 |
| 6,0 | 2 |
| 10,0 | 2 |

Os adutos foram analisados com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (API 6500, ABSciex). As transições escolhidas para quantificação e qualificação dos adutos encontram-se na tabela 3.6.

Tabela 3.6. Transições monitoradas no método de SRM para detecção e quantificação do aduto de 1,N²-propanodGuo.

| Aduto | Transição (m/z) |
|--|-----------------|
| [¹⁵ N ₅ ¹³ C ₄]-1,N ² -propanodGuo (padrão Interno) | 347,1 → 181,0 |
| [¹³ C ₄]-1,N ² -propanodGuo, | 342,1 → 226,0 |
| | 342,1 → 180,0 |
| [¹³ C ₂]-1,N ² -propanodGuo | 340,1 → 224,0 |
| | 340,1 → 180,0 |
| [¹³ C ₂]-1,N ² -propanodGuo | 340,1 → 178,0 |
| | 338,1 → 222,0 |
| 1,N ² -propanodGuo | 338,1 → 178,0 |

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da transição de maior intensidade (transição de quantificação) e para transições de qualificação com menor sinal de interferentes. Sendo que, curtain gas (fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente) foi de 20 psi, temperatura 400 °C, gás de nebulização e gás auxiliar 50 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Spray Ion Drive 5500 V, gás de

colisão alto, aquecimento da interface *heater* ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V.

3.5.5. Análise da formação de 1,N²-propanodGuo endógeno e exógeno por Nano-LC/ESI-HRMS³

Foi utilizado um sistema de Nano-LC (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, USA) acoplado a um instrumento Orbitrap Fusion Lumos equipado com uma fonte nanospray (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, USA). Os solventes do nano-LC foram 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B). As amostras (3 µL) foram injetadas em uma coluna de trapeamento (Acclaim PepMap 75 µM, 2 cm, C18, 3µm, 100 A, Thermo Fisher Scientific Corp.) seguida de uma coluna nano (Acclaim PepMap RSLC (50 µM, 15 cm, C18. 2 µM, 100 A, Thermo Fisher Scientific Corp.). Após a injeção da amostra, o fluxo foi mantido a 500 bar para possibilitar que 20 µL do solvente A passasse pela coluna de trapeamento. O fluxo foi então decrescido a 300 nL/min e mantido a 2% de B por 14 min. A fase orgânica foi linearmente crescente para 13% de B em 6 min e depois para 95% de B em 15 min. Sob essas condições, os dois isômeros de 1,N²-propanodGuo eluíram em 25,40 min e 26,10 min, respectivamente.

As análises de Nano-LC/ESI⁺-HRMS³ foram conduzidas no modo Nano ESI⁺ utilizando um instrumento Orbitrap Fusion Lumos Instrument (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Os parâmetros de análise incluem uma spray voltage a 1950 kV, a temperatura do capilar em 300°C, e níveis S-Lens RF de 30%. As análises de MS³ foram realizadas isolando-se os íons [M+H]⁺ de 1,N²-propanodGuo (m/z 338,146, 340,145 e 342,159) e (m/z 347,137 para o padrão

interno) no analisador quadrupolo (isolamento de largura em 1.6 m/z) e foram fragmentados utilizando uma célula de dissociação por alta energia de colisão (HCD) com uma energia de colisão normalizada em 30%. Os fragmentos resultantes de MS/MS correspondendo a perda da ribose [M+H-2-D-eritropentose]⁺ (m/z 222,098, 224,097, 226,112 e 231,089) foram sujeitas a uma segunda fragmentação usando célula de dissociação induzida por colisão (CID) usando nitrogênio como gás de colisão, com uma energia de colisão normalizada em 30% e isolamento de largura de 1,6 (m/z). Os fragmentos resultantes de MS³ foram detectados na faixa de massa de m/z 100–400 utilizando o analisador de massas orbitrap, com resolução de 30.000.

Os pares MS¹/MS² de 338/222, 340/224 e 347/231 foram obtidos usando um AGC target of 5e⁴ e tempo máximo de injeção (ms) de 54, 118 e 118, respectivamente. O par 342/226 usou um AGC target de 1e⁵ e tempo máximo de injeção de 246 ms. Um scan de MS também foi realizado na faixa de massas de m/z 100–400 com resolução de 30.000 para monitoramento de qualquer componente da matriz que possa co-eluir com os adutos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização de adutos de DNA

4.1.1. 8-oxodGuo

O aduto de 8-oxodGuo e seu padrão interno isotopicamente marcado foram sintetizados e purificados como descrito em materiais e métodos (3.3.1). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente em $\lambda = 293$ nm ($\epsilon = 9600$). A figura 4.1 mostra o espectro de massas do aduto, que foi comparado ao espectro obtido por Lin *et al.*, (1995) para confirmação estrutural.

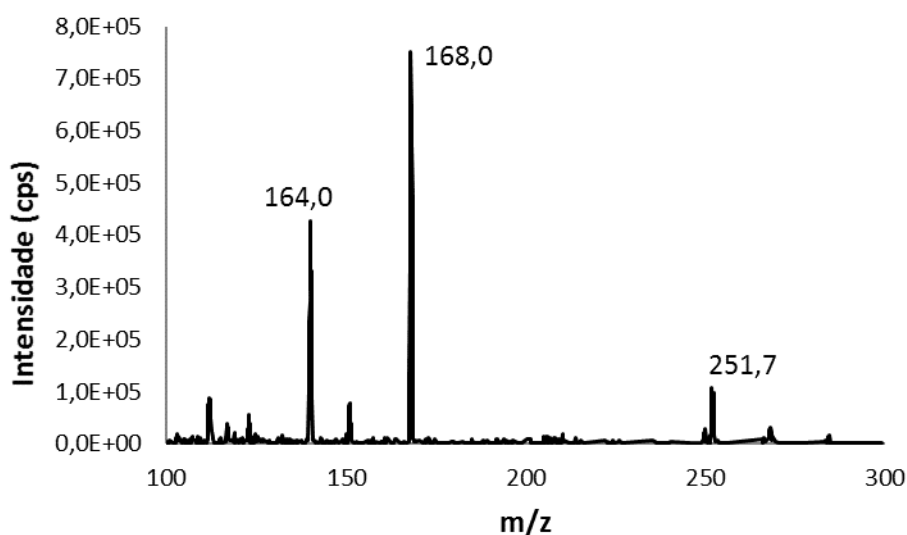


Figura 8. Espectro de massas de MS² do aduto 8-oxodGuo.

Após análise dos fragmentos gerados pelo aduto 8-oxodGuo, foram escolhidas as transições: 284,1 \rightarrow 167,9 para quantificação do aduto, 284,1 \rightarrow 167,9 para confirmação estrutural e 289,1 \rightarrow 172,9 para quantificação do padrão interno.

4.1.2. 1,N²- ϵ dGuo

O aduto de 1,N²- ϵ dGuo e seu padrão interno isotopicamente marcado foram sintetizados e purificados como descrito em materiais e métodos (3.3.2). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente em $\lambda = 226$ nm ($\epsilon = 49937$). A figura 4.2 mostra o espectro de massas do aduto, que foi comparado ao espectro obtido por Loureiro *et al.*, (2000) para confirmação estrutural.

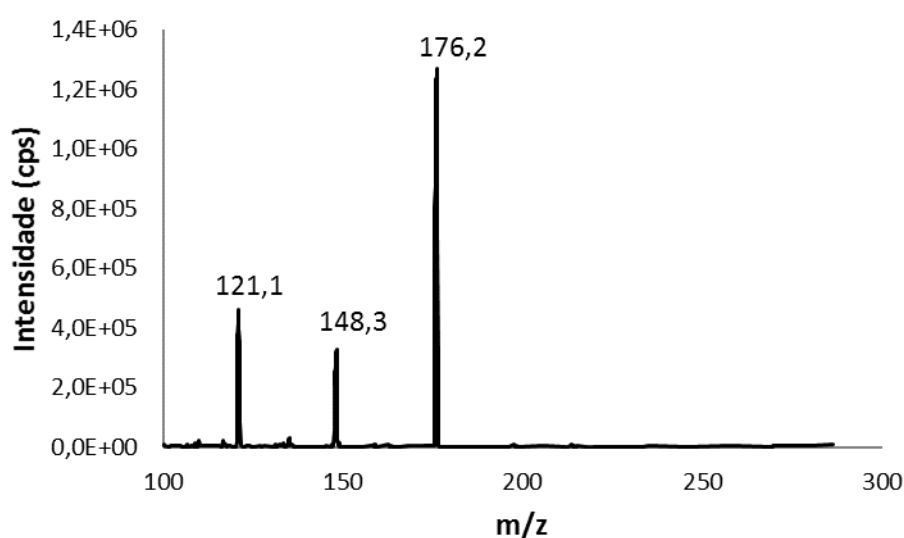


Figura 9. Espectro de massas de MS² do aduto 1,N²- ϵ dGuo.

Após análise dos fragmentos gerados pelo aduto, foram escolhidas as transições: 292,1 \rightarrow 176,0 para quantificação, 292,1 \rightarrow 121,0 para confirmação estrutural e 297,1 \rightarrow 181,0 para quantificação do padrão interno.

4.1.3. 1,N²-propanodGuo

O padrão não marcado 1,N²-propanodGuo, o aduto formado com duas moléculas de acetaldeído isotopicamente marcado [¹³C₄]-1,N²-propanodGuo e

o padrão isotopicamente marcado com nitrogênio e carbono [$^{13}\text{C}_4, ^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo foram sintetizados e purificados como descrito em materiais e métodos (3.3.3). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente em $\lambda = 254 \text{ nm}$ ($\epsilon = 15600$). A figura 4.3 mostra o espectro de massas do aduto, que foi comparado ao espectro obtido por Garcia, (2010) para confirmação estrutural.

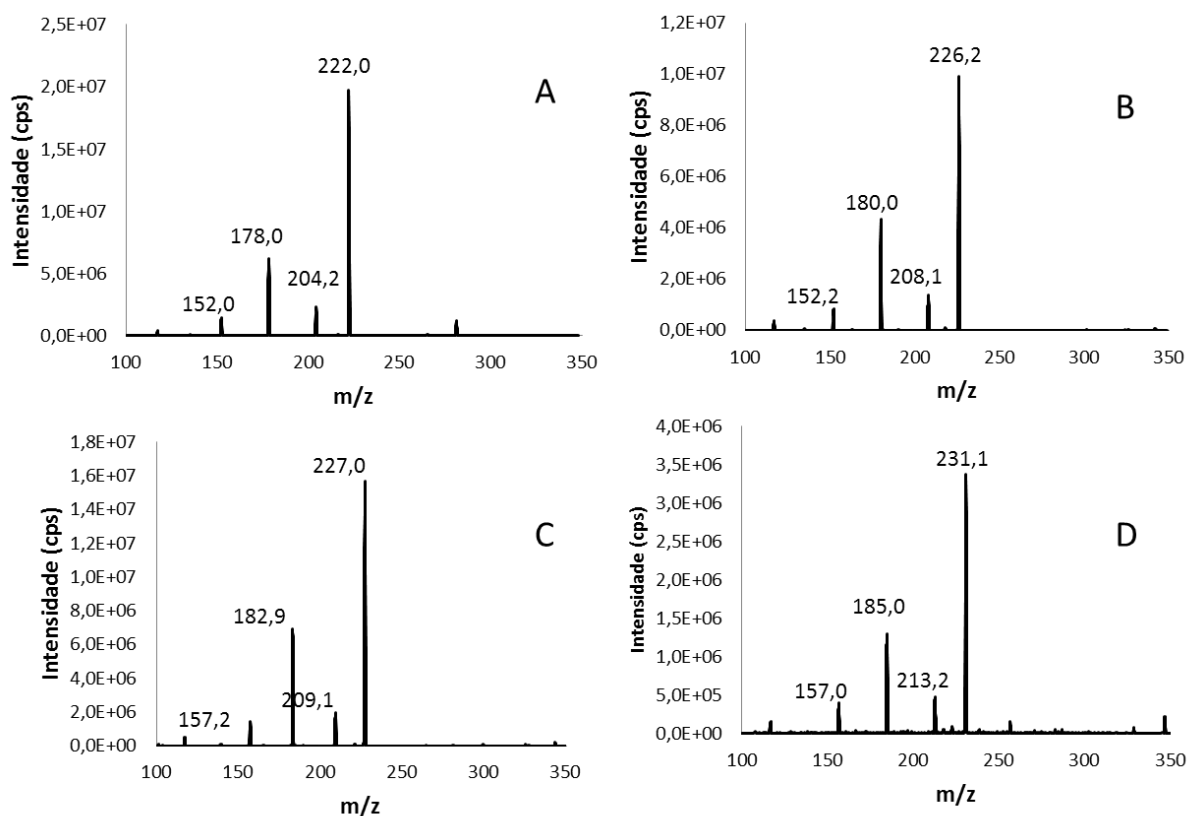


Figura 10. Espectro de massas de MS² dos adutos (A) 1, N^2 -propanodGuo, (B) [$^{13}\text{C}_4$]-1, N^2 -propanodGuo, (C) [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo e (D) [$^{15}\text{N}_5, ^{13}\text{C}_4$]-1, N^2 -propanodGuo.

Após análise dos fragmentos gerados pelos adutos, foram escolhidas as transições: 338,1 \rightarrow 222,0 para quantificação e 338,1 \rightarrow 178,0 para confirmação estrutural de 1, N^2 -propanodGuo ; 340,1 \rightarrow 224,0 para quantificação e 340,1 \rightarrow 178,0 para confirmação estrutural de [$^{13}\text{C}_2$]-1, N^2 -propanodGuo; 342,1 \rightarrow 226,0 para quantificação e 342,1 \rightarrow 180,0 para

confirmação estrutural de $[^{13}\text{C}_4]\text{-}1,N^2\text{-propanodGuo}$; $343,1 \rightarrow 227,0$ para quantificação do padrão interno de $[^{15}\text{N}_5]\text{-}1,N^2\text{-propanodGuo}$ e $347,1 \rightarrow 231,0$ para quantificação do padrão interno de $[^{15}\text{N}_5, ^{13}\text{C}_4]\text{-}1,N^2\text{-propanodGuo}$.

4.1.4. $1,N^2\text{-HO-propanodGuo}$

O aduto de $1,N^2\text{-HO-propanodGuo}$ e seu padrão interno isotopicamente marcado foram sintetizados e purificados como descrito em materiais e métodos (3.3.4). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente em $\lambda = 257 \text{ nm}$ ($\epsilon = 18000$). A figura 4.4 mostra o espectro de massas do aduto, que foi comparado ao espectro obtido por Chung *et al.*, (1984) para confirmação estrutural.

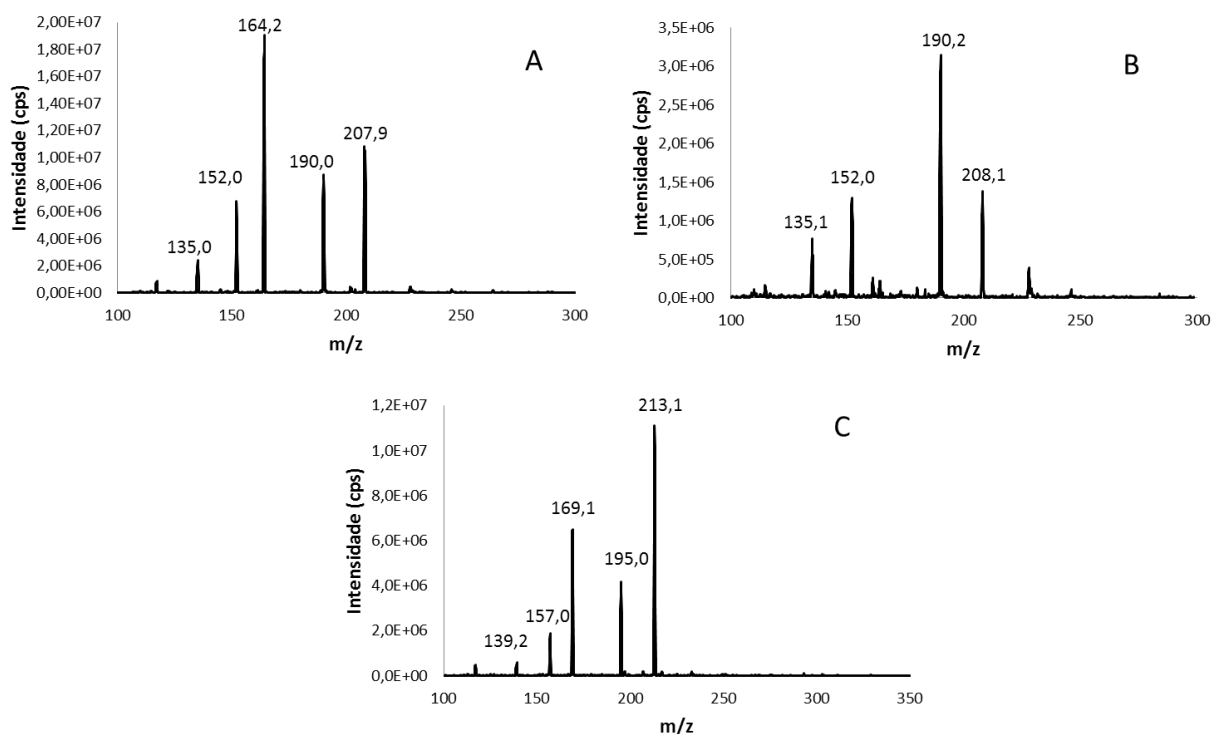


Figura 11. Espectro de massas de MS² dos adutos (A) $\gamma\text{-}1,N^2\text{-HOpropanodGuo}$, (B) $\alpha\text{-}1,N^2\text{-HOpropanodGuo}$ e (C) $[^{15}\text{N}_5]\text{-}1,N^2\text{-HOpropanodGuo}$

Após análise dos fragmentos gerados pelo aduto, foram escolhidas as transições: 324 → 208,0 para quantificação, 324,1 → 164,0 para confirmação estrutural do isômero γ -1, N^2 -HOpropanodGuo ; 324,1 → 152,0 para confirmação estrutural do isômero α -1, N^2 -HOpropanodGuo e 329,1 → 213,0 para quantificação do padrão interno.

4.1.5. 1, N^2 -HO-medGuo

O aduto de 1, N^2 -HO-medGuo e seu padrão interno isotopicamente marcado foram sintetizados e purificados como descrito em materiais e métodos (3.3.5). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente em $\lambda = 254$ nm ($\epsilon = 14600$). A figura 4.5 mostra o espectro de massas do aduto, que foi comparado ao espectro obtido por Lu *et al.*, (2010) para confirmação estrutural.

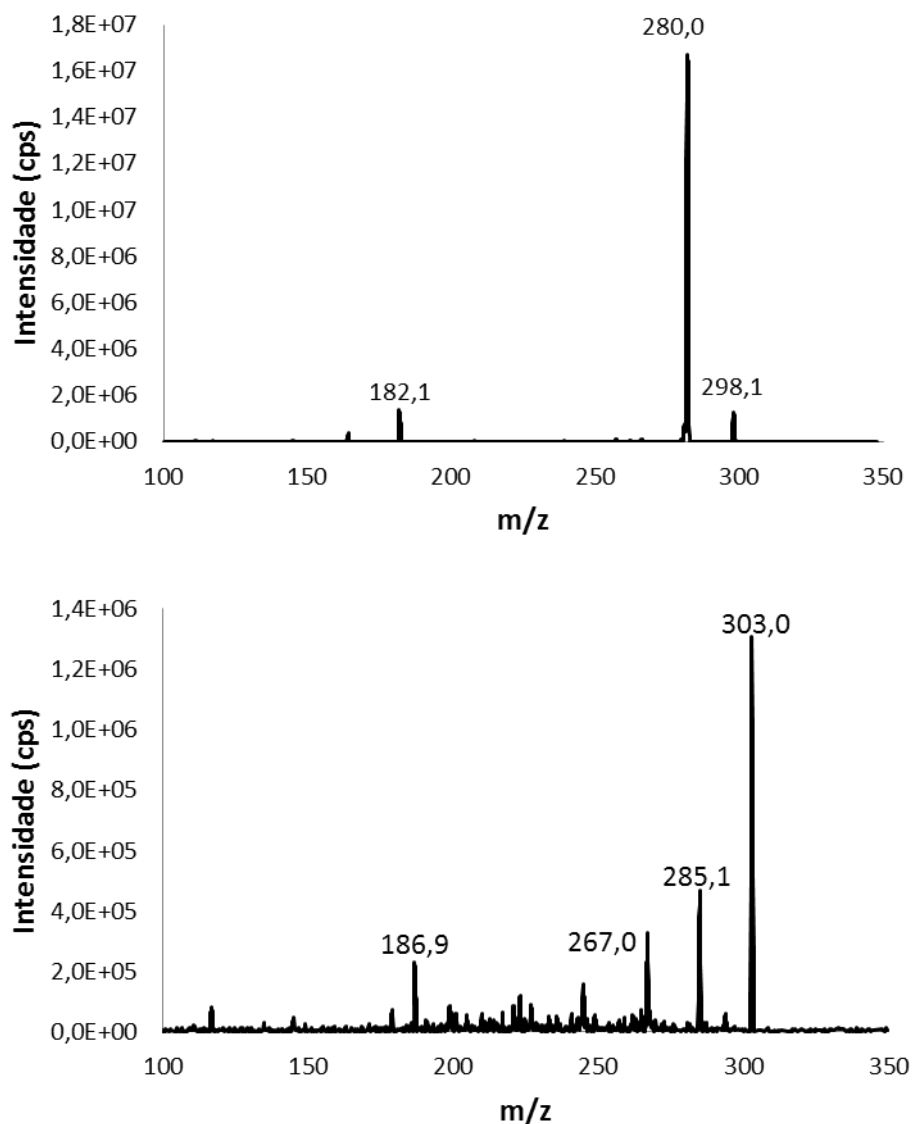


Figura 12. Espectro de massas de MS² do aduto (A) 1,*N*²-MeOHdGuo e seu padrão isotopicamente marcado, (B) [¹⁵N₅]-1,*N*²-MeOHdGuo.

Após análise dos fragmentos gerados pelo aduto, foram escolhidas as transições: 298,1 → 181,9 para quantificação, 298,1 → 164,0 para confirmação estrutural e 303,1 → 187,0 para quantificação do padrão interno.

4.2. Desenvolvimento da metodologia para detecção dos adutos de DNA por HPLC-ESI⁺-MS/MS

O método para detecção simultânea de cinco adutos de DNA foi adaptado da metodologia descrita em Garcia *et al*, 2010. Primeiramente, os adutos foram sintetizados, purificados e caracterizados. Isso possibilitou que todos os parâmetros de ionização e fragmentação do espectrômetro de massas como a voltagem do cone, temperaturas, pressões dos gases nebulizadores e de colisão fossem otimizados, no intuito de garantir as melhores condições de ionização e fragmentação dos adutos.

A estratégia utilizada para a padronização das condições cromatográficas foi isolar os nucleosídeos não modificados dos adutos de DNA para que não houvesse co-eluição e conseqüentemente, supressão de sinal no espectrômetro massas, uma vez que a concentração desses nucleosídeos é muito superior à concentração dos adutos. Para isso, inicialmente os adutos e nucleosídeos não modificados foram eluídos em uma coluna com gradiente de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila e com fluxo de 500 µL/min.

Um sistema de válvulas foi utilizado para que os primeiros 20 min de corrida fossem direcionados para o descarte enquanto uma segunda bomba era usada para alimentar uma segunda coluna com fluxo isocrático de 250 µL/min com uma solução de 20 % de acetonitrila contendo 0.1% ácido fórmico, mantendo o fluxo constante para o espectrômetro de massa durante a análise. A segunda coluna possui dimensões de comprimento, diâmetro e tamanho de partícula menores que a primeira coluna, o que aumentou consideravelmente a resolução dos picos. Aos 20 min, o eluente da primeira coluna, que até o

momento era descartado, entra na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massas, e aos 40 min a válvula volta a fechar, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna. O tempo total desta análise é de 50 min.

Na figura 13 é possível visualizar um cromatograma representativo de uma amostra de DNA de timo de bezerro, hidrolisada com a adição de 2 fmol de cada aduto e 10 fmol dos adutos isotopicamente marcados. A eluição dos nucleosídeos modificados pode ser observada pela detecção por SRM no espectrômetro de massas em (A) e a eluição dos nucleosídeos não modificados, pelo detector de UV operando em 260 nm (G), sendo que o primeiro aduto, HO-medGuo eluiu com 22,30 min e o último aduto, o isômero 6S, 8S, 1,*N*²-propanodGuo eluiu em 36,38 min. Em relação aos nucleosídeos não modificados, observa-se que a dGuo elui em 16,81 min, permitindo sua quantificação simultânea aos adutos durante a corrida e o último nucleosídeo não modificado a eluir é a dAdo, em 23,33 min. Não foi possível isolar todos os nucleosídeos não modificados dos adutos devido as características químicas similares entre eles. No entanto, amostras de DNA de timo de bezerro hidrolisadas com a adição de padrões dos adutos foram comparadas com pontos da curva de calibração e não houve diminuição da área dos picos analisados.

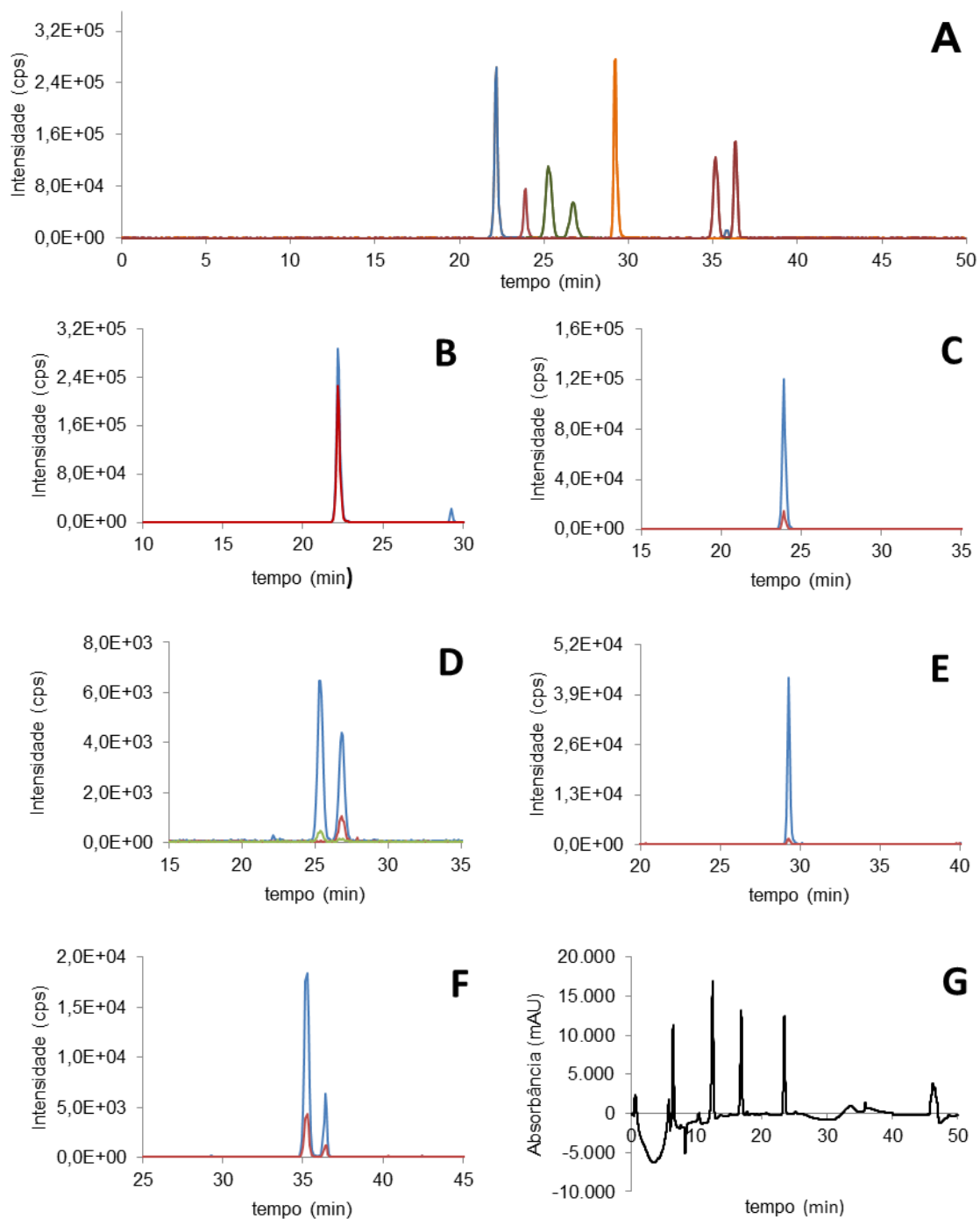


Figura 13. Cromatograma representativo de amostra de DNA de timo de bezerro contendo 10 fmol de padrões internos em (A) e 2 fmol dos adutos: 1, N²-HO-medGuo (B); 8-oxodGuo (C); 1, N²-HO-propanodGuo (D); 1, N²-εdGuo (E), 1, N²-propanodGuo (F) e o detector de UV em 260nm. As linhas azuis representam as transições de quantificação e as linhas vermelhas, transições de confirmação para cada aduto.

Curvas de calibração foram preparadas para cada aduto, com concentrações que variaram entre 10 fmol a 25 pmol, com adição de 1 pmol de

padrão interno, em 100 µg de DNA de timo de bezerro hidrolisado. As curvas foram calculadas pela relação entre o padrão não marcado e o padrão isotopicamente marcado. A Figura 14 mostra as curvas e as faixas de concentração para cada aduto. Para cada transição de quantificação o limite de detecção foi determinado pela relação de intensidade do sinal e o ruído maior que 10 e para as segundas transições de confirmação estrutural, uma relação sinal/ruído maior que 3.

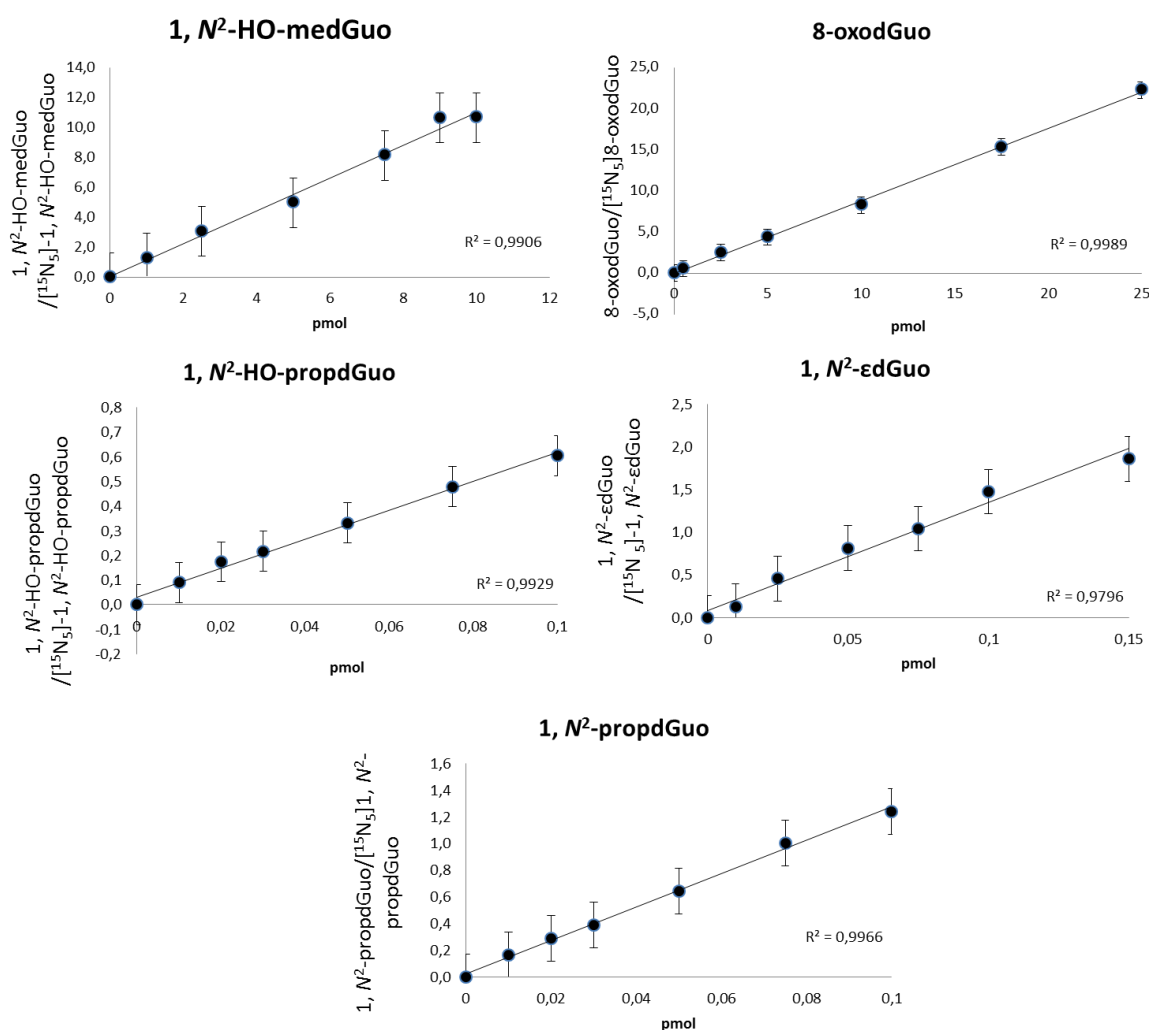


Figura 14 Curvas de calibração para os adutos 1, N²-HO-medGuo, 8-oxodGuo, 1, N²-HO-propanodGuo, 1, N²-εdGuo e 1, N²-propanodGuo.

4.2.1. Estudo de formação dos adutos de DNA de timo de bezerro expostos a fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis

Para validar a nova metodologia desenvolvida, a utilizamos para análise de adutos de DNA no intuito de identificar e relacionar os níveis desses compostos em cigarro de tabaco e de cannabis. Para isso, utilizamos 3 cigarros de marca líder e pesamos o conteúdo de tabaco em cada um para utilizar a média das pesagens e confeccionar os cigarros de cannabis (0,6 g/cigarro).

Após a exposição das soluções de DNA de timo de bezerro em tampão fosfato (pH = 7,4) as amostras foram submetidas a hidrólise enzimática após a adição dos padrões internos sintetizados e purificados. Seguiu-se com a análise dos adutos pela metodologia desenvolvida.

Foram realizados três experimentos de exposição para cada tipo de cigarro. A concentração de dGuo foi medida por HPLC/UV e os adutos quantificados. Nos grupos controle, foram detectados apenas níveis de 8-oxodGuo e 1,*N*²-HO-medGuo. Nos grupos expostos à fumaça do cigarro de tabaco foram detectados todos os adutos analisados, assim como nas amostras expostas à fumaça de cigarro de cannabis. A figura 15 mostra os níveis de cada aduto encontrado nas amostras controle e tratadas. Com exceção do aduto de acetaldeído, 1,*N*²-propanodGuo, é possível observar que os grupos expostos à fumaça de tabaco apresentam níveis maiores de adutos de DNA em relação ao grupo exposto à fumaça de cannabis.

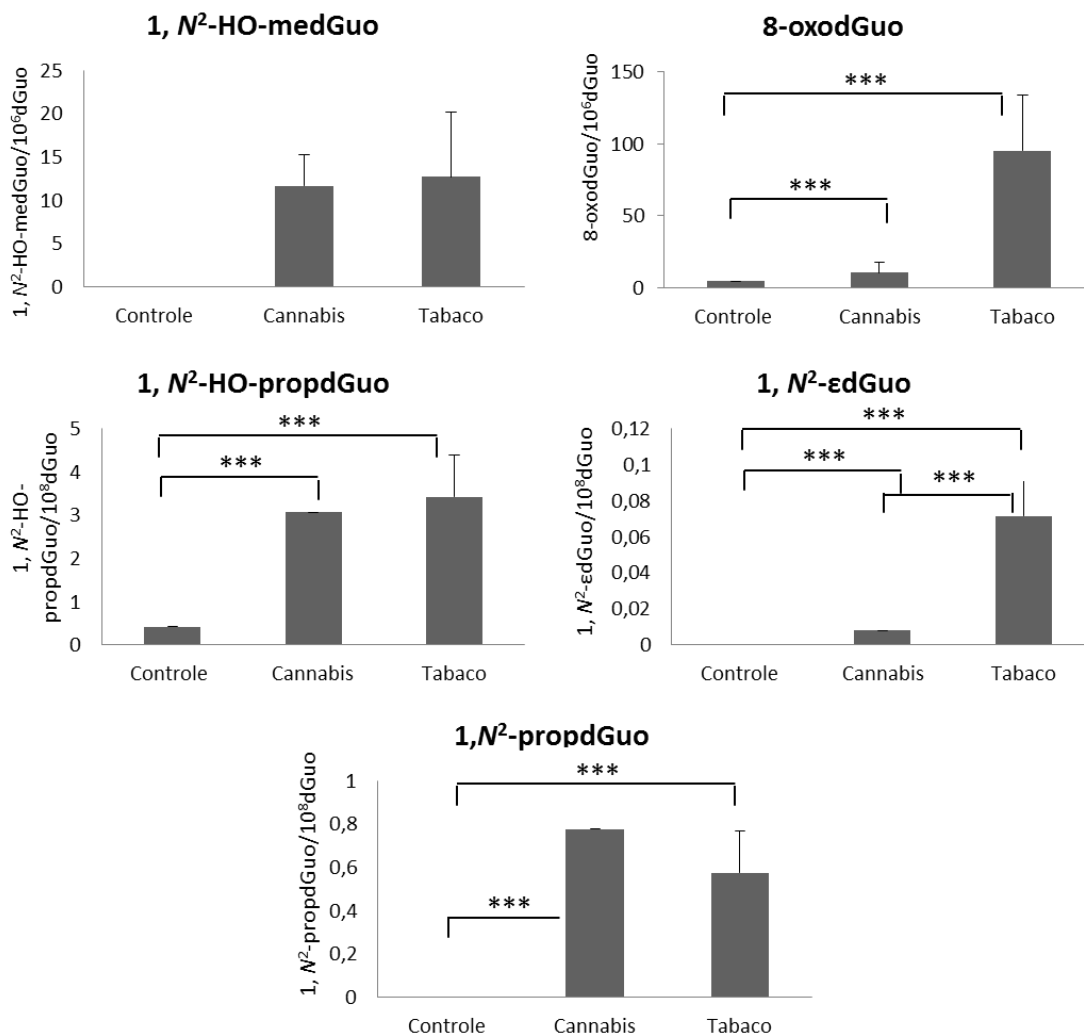


Figura 15. Níveis de adutos de DNA encontrados em solução de DNA de timo de bezerro tratado com a fumaça de tabaco e de cannabis, n=3. * representa $P < 0,05$; ** representa $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste.

4.2.2. Avaliação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi

Nossa proposta foi a de avaliar a presença de adutos de oxidação e de adição de aldeídos, em células deficientes na via de Anemia Fanconi, (responsável pelo reparo de *cross links*) utilizando metodologia de HPLC/MS/MS desenvolvida, no intuito de validar o método de quantificação dos adutos de DNA *in vivo*.

A análise dos grupos de células MEF *wild type* e MEF *Slx4^{-/-}* tratadas com 2 mM de acetaldeído estão apresentadas na Figura 16. Pode-se observar a formação de todos os adutos em níveis basais nos grupos controle e um pequeno aumento dos adutos 8-oxodGuo e 1,*N*²-propanodGuo. Os demais adutos apresentaram diferenças significativas entre o grupo *wild type* controle frente ao grupo *Slx4^{-/-}* tratado e também entre o controle e o grupo tratado *Slx4^{-/-}*. É possível observar que o tratamento com acetaldeído promoveu o aumento de adutos no grupo *wild type* e *Slx4^{-/-}* mas o grupo controle *Slx4^{-/-}* apresentou níveis basais maiores que o grupo controle *wild type*, o que evidencia a deficiência de reparo de *cross links* pela ausência da proteína envolvida no processo de excisão do DNA.

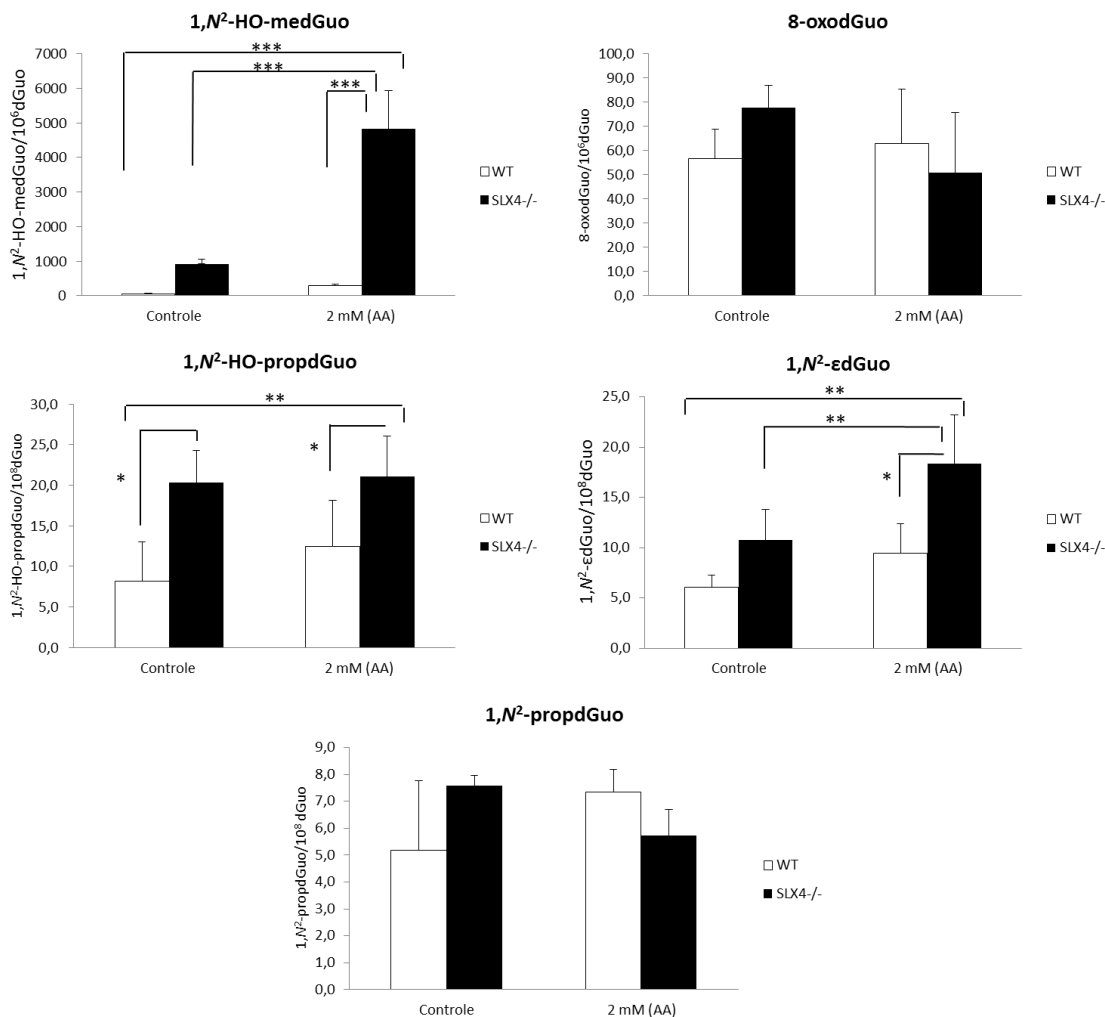


Figura 16. Quantificação de adutos de DNA em células MEF tratadas com 2 mM de acetaldeído (AA). * representa $P < 0,05$; ** representa $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, $n=6$.

4.2.3. Avaliação de adutos de DNA em modelo murino de Esclerose Lateral Amiotrófica

Para validar a metodologia dos adutos de DNA, utilizamos também ratos superexpressando proteína SOD1^{G93A} humana, modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), em DNA de músculo esquelético de animais sintomáticos e de ratos que expressam apenas SOD1 murina endógena, utilizados como grupo controle.

Em nosso laboratório, trabalhos anteriores mostraram que os animais modelo de ELA em idades precoces, quando ainda são assintomáticos, apresentam níveis de 1,N²-propanodGuo extremamente semelhantes aos animais irmãos de ninhada (*littermates*, expressam apenas SOD1 murina endógena). Contudo quando em fase sintomáticas aqueles animais (SOD1^{G93A}) apresentam um aumento de aproximadamente 50% nos níveis do aduto em DNA de cérebro. Esse resultado foi corroborado pelo aumento significativo de aldeídos totais neste tecido (Freitas, 2014).

Verificamos que em tecido de músculo de ratos SOD1^{G93A} (Figura 17), o aduto 1,N²-HO-medGuo apresenta aumento significativo em relação ao grupo controle. No entanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos controle e SOD1^{G93A} em relação aos demais aldeídos, apesar de ser notório que existe uma tendência de aumento no grupo sintomático para cada aduto.

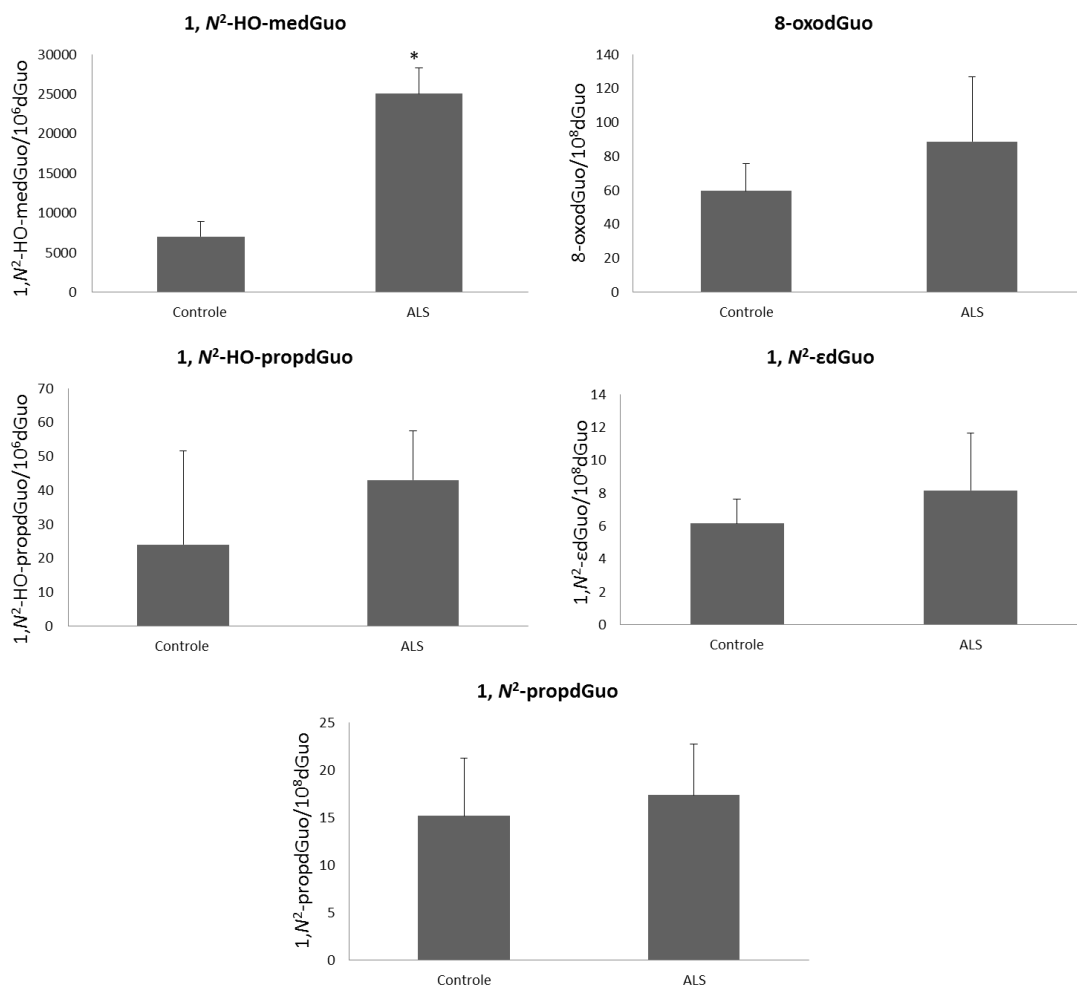


Figura 17. Quantificação de adutos de DNA em ratos controle e transgênicos para o gene *Sod1^{G93A}*, sintomáticos. * representa $P < 0,05$; pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, $n=4$.

4.4. Tratamento dos ratos Wistar com acetaldeído isotopicamente marcado

Nosso grupo recentemente mostrou a formação inequívoca de 1, N²-propanodGuo por acetaldeído em células de fibroblastos humanos via tratamento com [¹³C₂]-acetaldeído (Garcia *et al.*, 2011). Também quantificamos esse aduto em amostras urinárias humanas recolhidas de residentes de uma cidade poluída (São Paulo) e de uma região não poluída (São João da Boa Vista). Os resultados mostraram níveis significativamente mais elevados de

1,*N*²-propanodGuo nas amostras de doadores SP do que nas amostras de doadores da região não poluída (Garcia e Freitas, *et al.*, 2013).

Esses dados nos estimularam a perguntar se esse aduto pode ser formado, *in vivo*, por inalação. No presente estudo, 15 ratos machos adultos com 18 semanas de idade foram divididos em 3 grupos de cinco animais: grupo controle sem tratamento e grupos tratados com 0 ppb e 10 ppb de [¹³C₂] - acetaldeído durante 50 dias, correspondendo à concentração aproximada de acetaldeído em São Paulo.

As amostras de DNA foram hidrolisadas e os adutos enriquecidos por um método de extração em fase sólida (SPE). Após purificação por HPLC, as amostras foram analisadas por microLC-ESI⁺-MS/MS, por monitoramento de reação selecionada (SRM) e para cada aduto foram monitoradas duas transições, sendo uma de quantificação e outra de confirmação estrutural. O padrão duplamente marcado de [¹⁵N₅, ¹³C₄]-1, *N*²-propanodGuo foi sintetizado e purificado para atuar como padrão interno nas amostras.

As figuras 18, 19 e 20 mostram cromatogramas representativos de amostras de cérebro dos grupos ambiente (controle sem inalação), 0 ppb (inalação de ar purificado) e 10 ppb de acetaldeído marcado. É possível observar a formação do aduto em todos os grupos, porém, apenas no grupo 10 ppb foram detectados os adutos da adição de uma molécula de acetaldeído isotopicamente marcada [¹³C₂] -1, *N*²-propanodGuo e da adição de duas moléculas isotopicamente marcadas [¹³C₄] -1, *N*²-propanodGuo, originadas pela inalação.

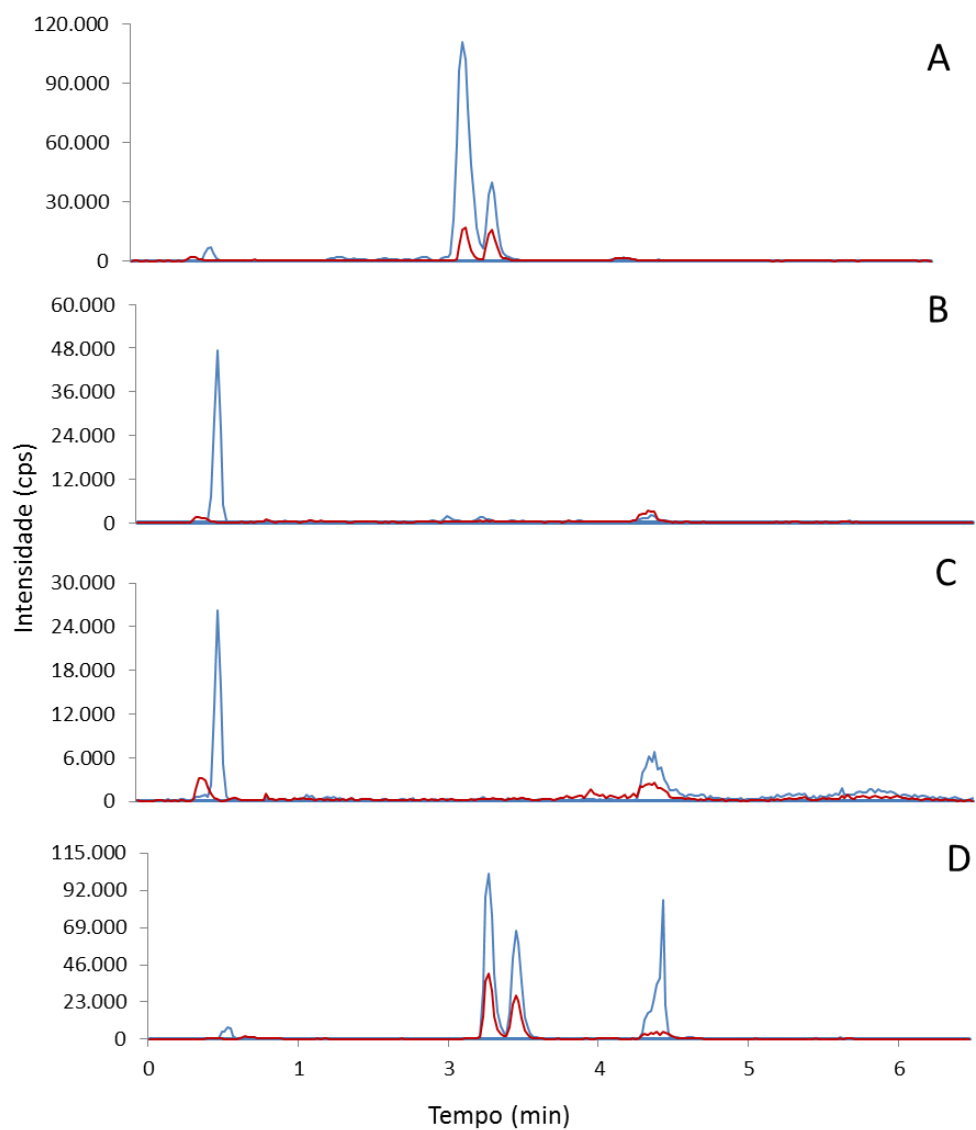


Figura 18. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro controle. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

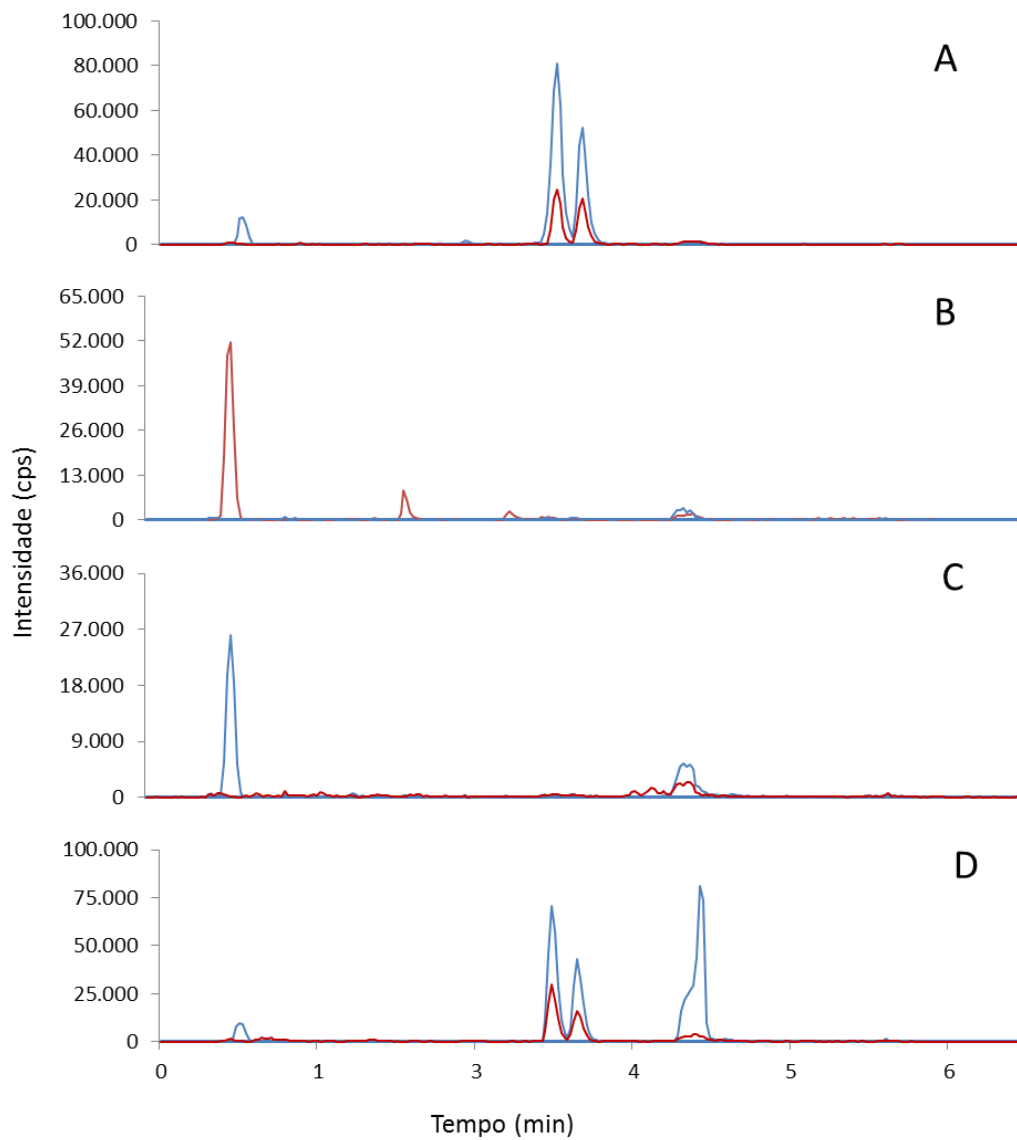


Figura 19. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro de ratos que inalaram ar purificado (0 ppb). (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

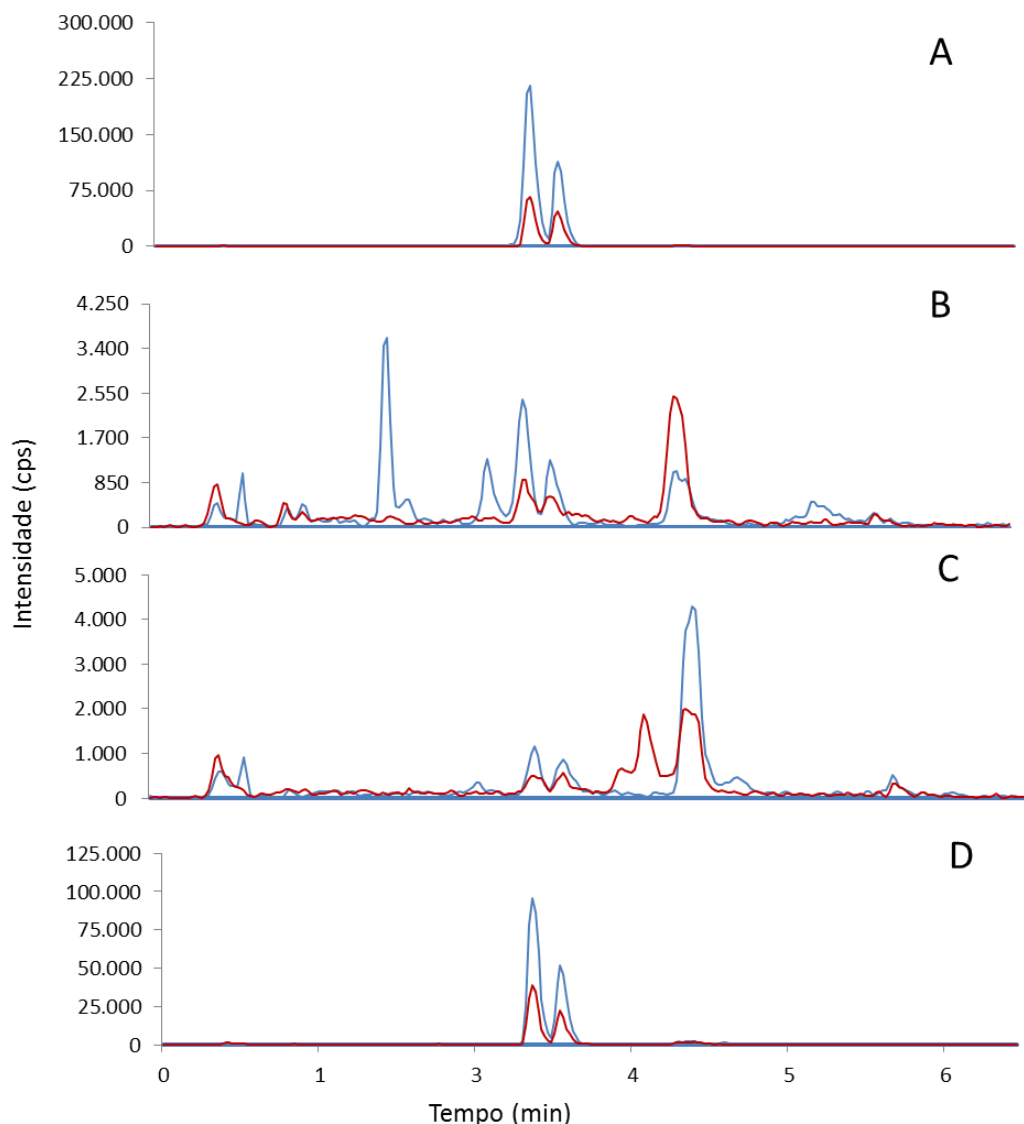


Figura 20. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de cérebro de ratos que inalaram 10 ppb de $[^{13}\text{C}_2]$ -acetaldeído. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

As Figuras 21, 22 e 23 mostram os cromatogramas representativos de amostras de pulmão dos grupos ambiente (controle sem inalação), 0 ppb e 10 ppb. Assim como no cérebro, é possível observar que o aduto endógeno é formado em todos os grupos, porém, apenas no grupo 10 ppb foram detectados os adutos da adição de uma molécula de acetaldeído

isotopicamente marcada $[^{13}\text{C}_2]$ -1, N^2 -propanodGuo e da adição de duas moléculas isotopicamente marcadas $[^{13}\text{C}_4]$ -1, N^2 -propanodGuo.

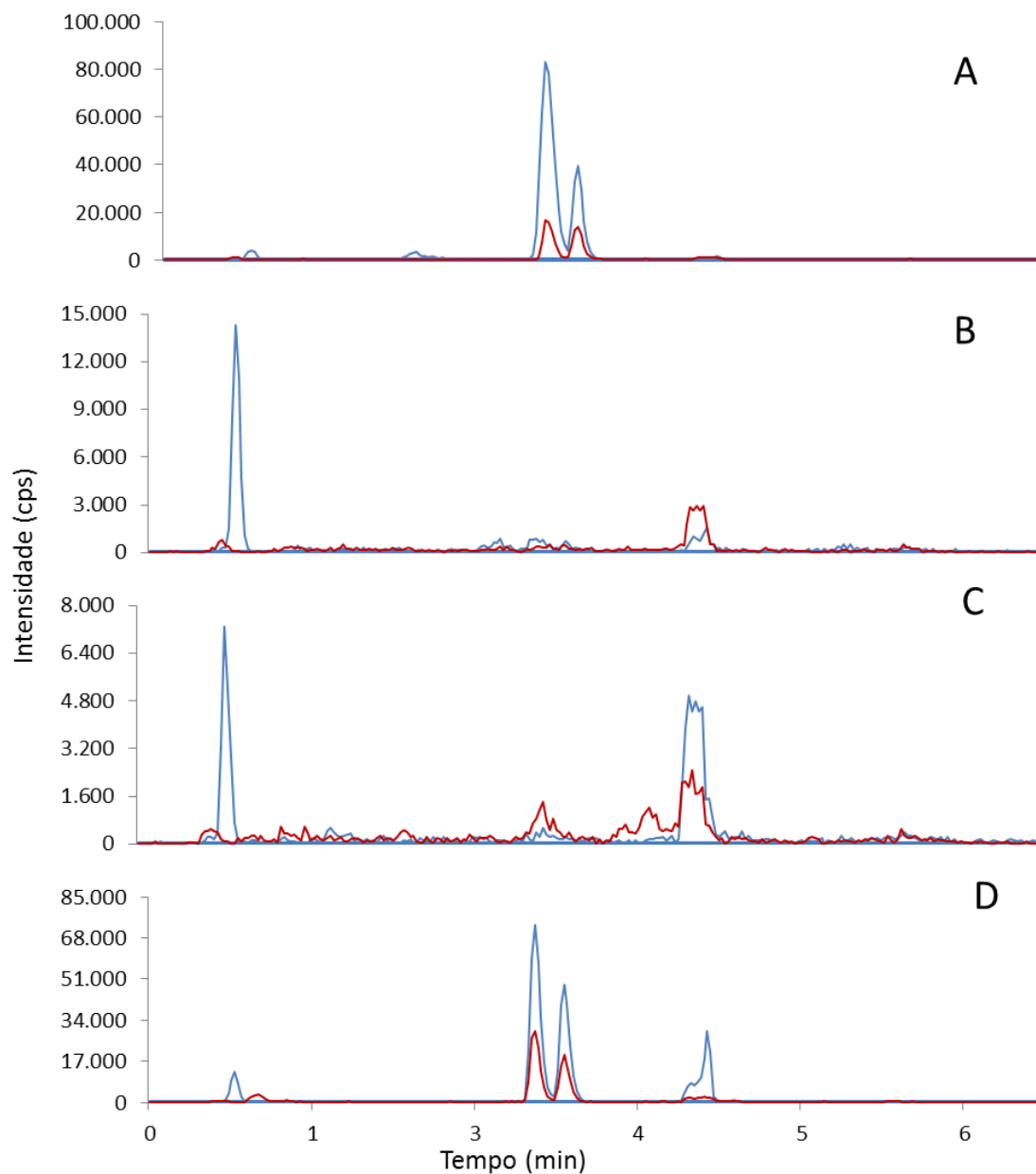


Figura 21. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão controle. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcadas e (D) para o padrão interno.

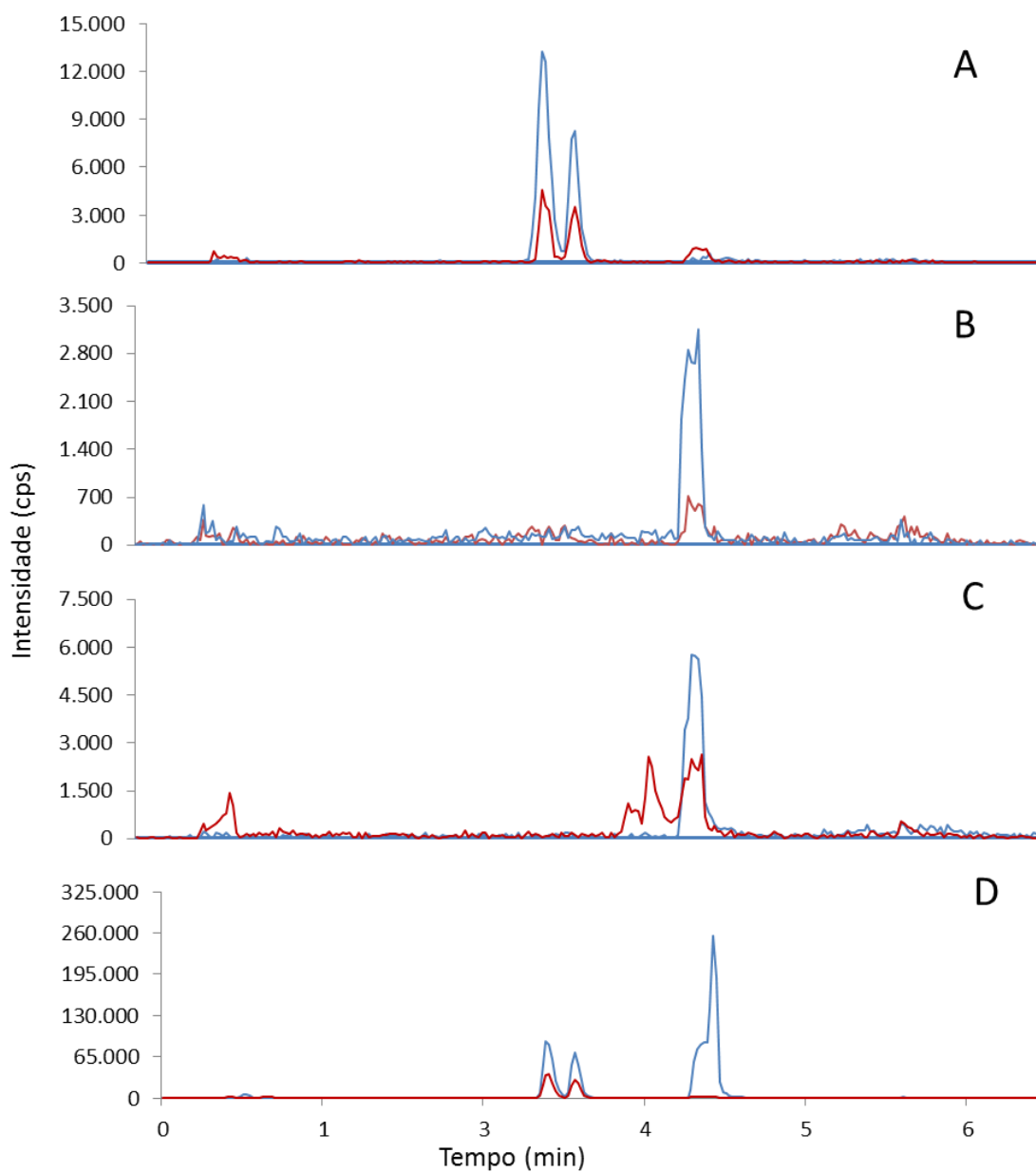


Figura 22. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão de ratos que inalaram ar purificado (0 ppb). (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

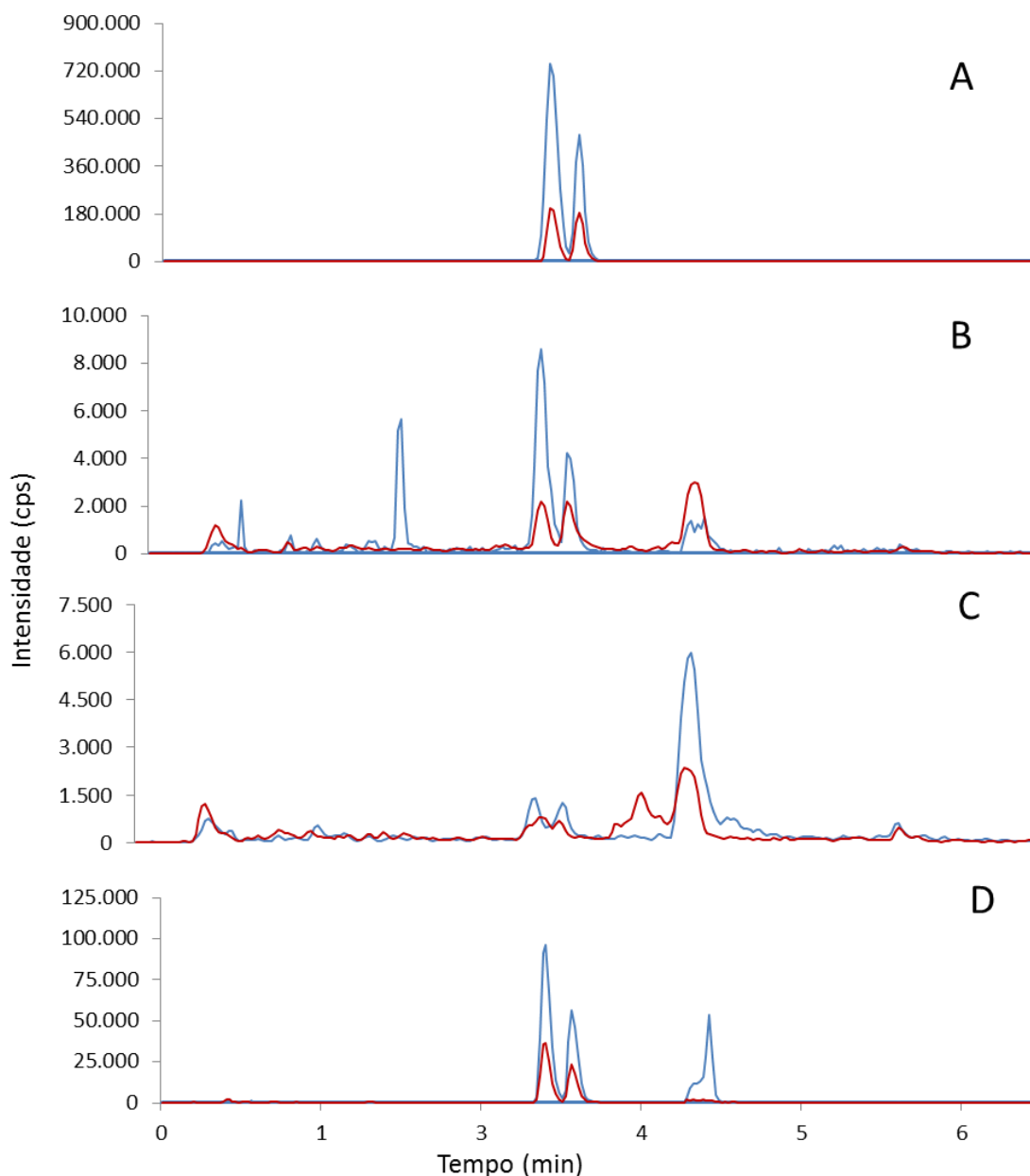


Figura 23. Cromatograma representativo de uma amostra de DNA de pulmão de ratos que inalaram 10 ppb de $[^{13}\text{C}_2]$ -acetaldeído. (A) mostra as transições para o aduto endógeno; (B) para o aduto com adição de uma molécula isotopicamente marcada; (C) para o aduto com adição de duas moléculas isotopicamente marcada e (D) para o padrão interno.

Os níveis dos adutos nos tecidos do pulmão e do cérebro foram também quantificados em DNA de ratos expostos ao $[^{13}\text{C}_2]$ -acetaldeído. Os níveis de $[^{13}\text{C}_2]$ -1, N^2 -propanodGuo foram $0,9 \pm 0,6$ e $2,8 \pm 0,4$ aduto / 10^9 dGuo no cérebro e pulmão, respectivamente. A relação sinal/ruído para o aduto $[^{13}\text{C}_4]$ -1,

N^2 -propanodGuo estava abaixo dos níveis de quantificação. O aduto endógeno não marcado $1,N^2$ -propanodGuo, também foi detectado e quantificado em ambos os tecidos (Figura 24). A formação de adutos endógenos foi considerada como um produto de aldeídos produzidos durante o processo de peroxidação lipídica. Os níveis do aduto são menores no cérebro que curiosamente apresentou níveis menores de $1,N^2$ -propanodGuo no grupo tratado com 10 ppb em relação ao grupo controle e a diferença é significativa em relação ao grupo 0 ppb, que apresentou níveis elevados do aduto. No pulmão, observa-se que a diferença entre o grupo 10 ppb é significativa em relação ao grupo controle e 0 ppb.

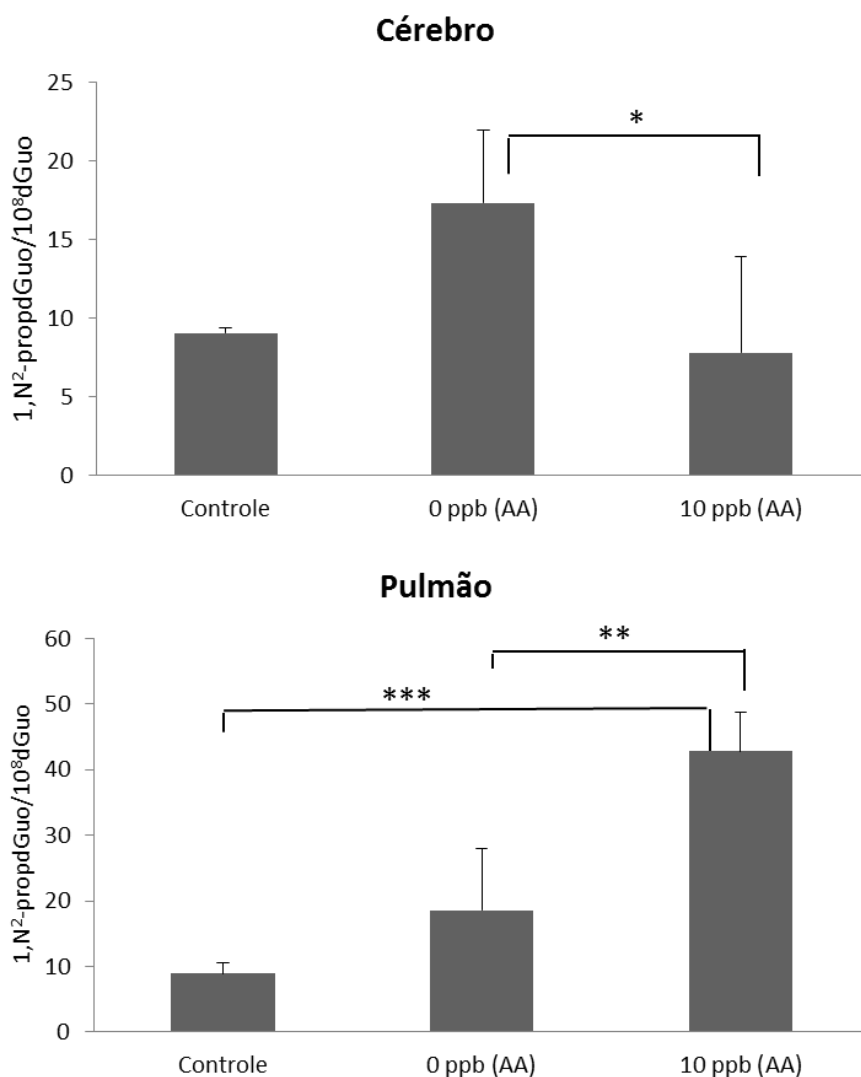


Figura 24. Níveis de 1,N²-propanodGuo em cérebro e pulmão de ratos controle, 0 ppb e 10 ppb. * representa P<0,05; ** representa P<0,01 e ***P<0,001, pelo teste estatístico one-way analysis of variance (ANOVA), com Tukey-Kramer como pós-teste, n=5.

Desenvolvemos um método de nanoLC /nanoESI⁺-HRMS³ (Orbitrap Fusion Lumos) para realizar a confirmação estrutural dos produtos, utilizando um pool de DNA de tecido pulmonar (Figura 25). Os adutos 1,N²-propanodGuo, [¹³C₂] -1, N²propanodGuo e [¹³C₄] -1, N²-propanodGuo foram detectados e os seus espectros de MS³ foram adquiridos, confirmando inequivocamente a identidade de todos os três produtos.

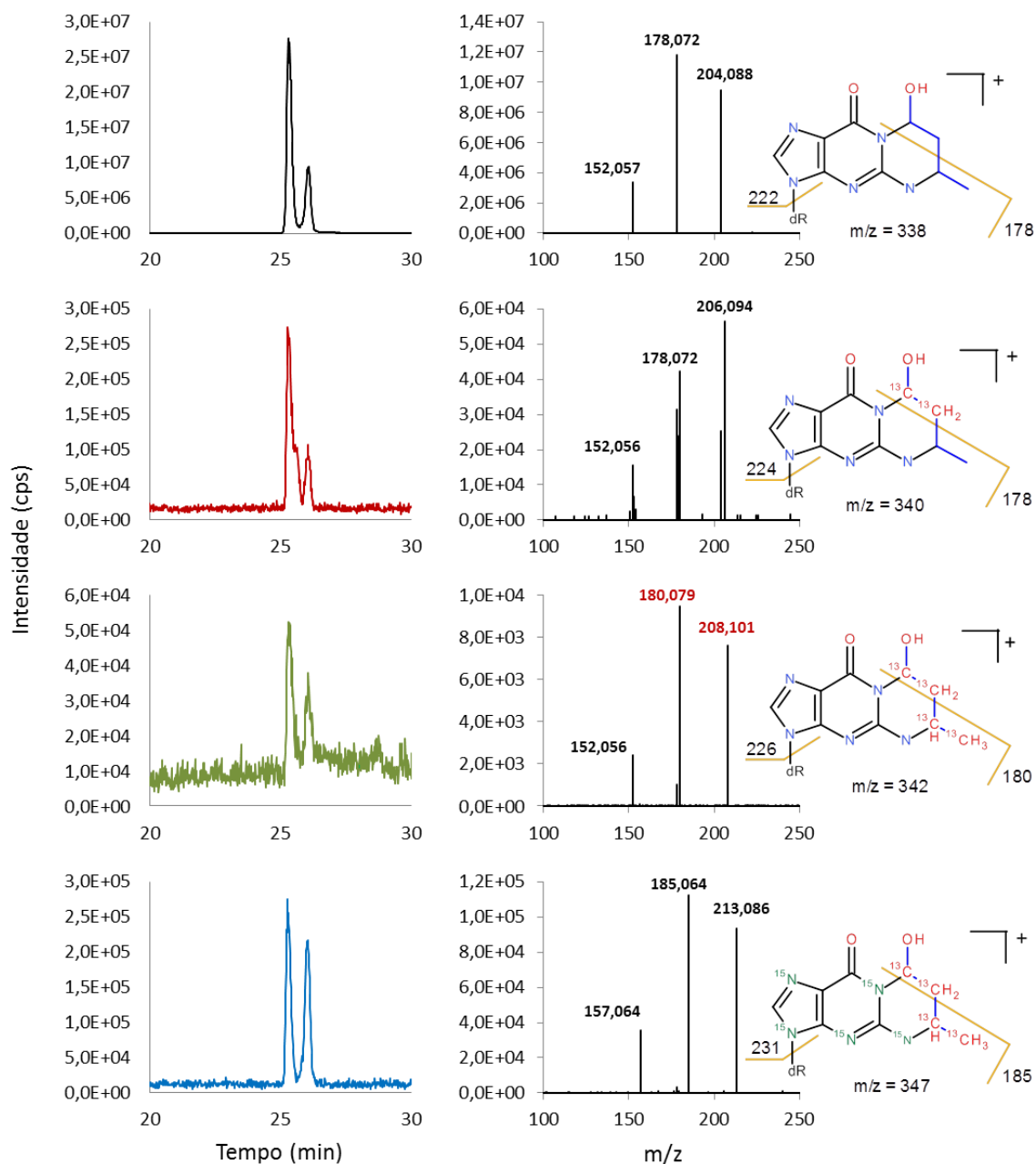


Figura 25. Cromatograma representativo e espectro de MS³ para (A) 1,N²-propanodGuo, (B) [¹³C₂]-1,N²-propanodGuo, (C) [¹³C₄]-1,N²-propanodGuo and (D) [¹³C₄,¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo (padrão interno) em um pool de amostras de DNA de pulmão tratadas com 10 ppb de [¹³C₂]-acetaldeído. (dR = 2'-deoxyribose).

5. DISCUSSÃO

Muitos trabalhos têm focado a relação entre a exposição à poluição ao câncer e outras doenças. Esta relação envolve fatores complexos como misturas de compostos, fatores físicos e ambientais e estilo de vida e saúde, o que dificulta o estudo dos mecanismos biológicos e químicos de como esses poluentes afetam a saúde humana. Por isso, o estudo por meio de biomarcadores é uma alternativa importante e pode produzir informações sobre alvos e mecanismos específicos da exposição aos poluentes e sua relação com a geração de mutações e câncer.

5.1. Desenvolvimento da metodologia para detecção dos adutos de DNA por HPLC-ESI-MS/MS.

Ao longo dos anos, foi desenvolvida uma gama de técnicas e métodos para estudar a formação de adutos de DNA endógenos e exógenos. Contudo, para a detecção, identificação e quantificação simultâneas de adutos de DNA conhecidos e desconhecidos, a espectrometria de massa é considerada a técnica mais apropriada. Recentemente, as especificações da LC-MS/MS melhoraram muito, e as medições de múltiplos adutos de DNA durante uma única análise são agora possíveis devido a alta sensibilidade e resolução dos aparelhos mais modernos (Sugimura, 2016). O adutoma, ou o estudo abrangente de adutos de DNA em tecidos humanos, abriu o caminho para a compreensão do estado de modificações de DNA causadas por agentes mutagênicos ambientais, carcinógenos e produtos endógenos de DNA

prejudiciais, como espécies reativas de oxigênio. Utilizando a abordagem *up-down*, a análise não direcionada (também conhecida como "fingerprinting") refere-se à detecção de todos os compostos presentes, mesmo que desconhecidos ou julgados irrelevantes na época (Hemeryck, Moore e Vanhaecke, 2016).

Neste trabalho empregamos a estratégia de *bottom-up*, ou seja, a detecção dirigida de tipos conhecidos de adutos de DNA, o que implica que o sistema de espectrômetro de massas verifica especificamente a presença de certos compostos de interesse para avaliar a sua presença e abundância, o que, aliado com a utilização de padrões isotopicamente marcados, possibilita a quantificação dessas lesões. Nosso interesse se concentra em aldeídos de cadeias pequenas, como o formaldeído, acetaldeído e acroleína, presentes em altas concentrações em centros urbanos onde o combustível fóssil e o etanol são utilizados em sua frota veicular.

O desenvolvimento de metodologia ultrasensível para detecção e quantificação de adutos de DNA foi possível graças ao extenso trabalho de síntese, purificação e caracterização dos padrões não marcados dos nucleosídeos modificados e seus respectivos padrões isotopicamente marcados. A utilização de padrões isotopicamente marcados confere ao método maior especificidade e permite a correção de perdas por preparo de amostras, injeção, etc.

Nós utilizamos a metodologia desenvolvida para avaliar a formação de adutos de DNA, mais especificamente de 2'-desoxiguanosina, em diversos modelos: *in vitro*, pela reação de DNA de timo de bezerro exposto à fumaça de

cigarro de cannabis e tabaco, além de modelos *in vivo*, com a detecção e quantificação de adutos de DNA em células modelo para Anemia de Fanconi e também em ratos modelo para Esclerose Lateral Amiotrófica.

5.1.1. Estudo de formação dos adutos de DNA de timo de bezerro expostos a fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis

Sabe-se que a fumaça de cigarro de tabaco é uma mistura complexa de agentes químicos, sendo mais de 100 destes, comprovadamente carcinogênicos. Além dos conhecidos PAH's e aminas aromáticas, compostos inorgânicos, catecóis e aldeídos também desempenham papel muito importante por estarem presentes em maiores concentrações no cigarro de tabaco e no de cannabis (Manicka *et al.*, 2012). O acetaldeído é o composto carbonílico presente em alta concentração no cigarro de tabaco (1110-2101 µg/cigarro), (Fujioka e Shibamoto, 2006). Outros aldeídos presentes no cigarro também são reconhecidamente mutagênicos, como o formaldeído, o crotonaldeído, o malonaldeído e a acroleína.

Paralelamente, encontram-se na fumaça de cigarro de cannabis mais de 60 tipos de canabinóides diferentes, apesar de seu poder mutagênico não ser bem estabelecido devido ao pequeno número de estudos a seu respeito. Devido a sua baixa combustibilidade, a fumaça de cannabis contém cerca de 50% a mais de compostos policíclicos aromáticos carcinogênicos do que a do tabaco (Matsuda *et al.*, 1999).

Devido à alta concentração de aldeídos e agentes oxidantes nos dois tipos de cigarros, foi possível observar a formação de todos os adutos

estudados pela metodologia desenvolvida, em especial no grupo tratado com fumaça de tabaco, que apresentou níveis de 8-oxodGuo muito altos, evidenciando a formação de radicais livres na queima do cigarro de tabaco. Além disso, houve formação dos adutos de formaldeído, acetaldeído e acroleína. Nas amostras tratadas com fumaça de cigarro de cannabis também foram detectados todos os adutos estudados em níveis menores, mas curiosamente o aduto de acetaldeído, 1,N²-propanodGuo apresentou níveis mais altos com a fumaça de cigarro de cannabis que em tabaco.

Já se sabe que a fumaça da cannabis provoca a formação da base de Schiff 1,N²-etilidenodGuo e seu produto de redução, o 1,N²-etilidenodGuo em DNA de timo do bezerro exposto à fumaça do cigarro de cannabis (Singh et al., 2009), mas não há estudos até agora que mostram a formação de propano adutos de acetaldeído e acroleína em DNA exposto. A formação do aduto 1,N²-edGuo nos dois tipos de cigarro, especialmente no de tabaco também mostra a possível presença de substâncias carcinogênicas ambientais como o cloreto de vinila e o carbamato de etila (uretano), duas substâncias conhecidamente formadoras de eteno adutos.

5.1.2. Avaliação de adutos de DNA em modelo celular de Anemia Fanconi

Nosso grupo publicou um trabalho demonstrando a formação inequívoca de 1,N²-propanodGuo em células humanas após tratamento com acetaldeído isotopicamente marcado pela metodologia de HPLC/MS/MS (Garcia et al, 2011). A metodologia para quantificação dos adutos de acetaldeído despertou o interesse do grupo do professor KJ Patel, da Universidade de Cambridge, Inglaterra, que nos propôs colaboração para avaliar adutos de DNA em modelo

celular de Anemia Fanconi. A proposta do professor Patel foi muito oportuna para validarmos esses adutos de DNA como biomarcadores de exposição ambiental em um modelo diferente e com isso, enriquecer nosso trabalho.

Indivíduos com anemia Fanconi exibem defeitos de desenvolvimento, insuficiência medular óssea e uma forte predisposição ao câncer. Mutações em genes que codificam proteínas que atuam no reparo de ligações cruzadas interfitas do DNA – via de AF (Auerbach, 2009) como a FANCL e SLX4 (FANCP) estão relacionadas à doença, fazendo com que células de pacientes com anemia Fanconi sejam suscetíveis a danos de DNA, especialmente crosslinks (Patel e Joeje, 2007). Alguns desses genes são especificamente requeridos na resistência celular ao acetaldeído. O grupo de Patel mostrou que células defeituosas para o gene FANCL são mais sensíveis a acetaldeído exógeno e ratos duplo mutantes para as vias de aldeído desidrogenase 2 e de FANCD são altamente sensíveis à exposição ao acetaldeído (Langevin et al, 2011).

Utilizando a metodologia desenvolvida, fomos capazes de estudar a formação de outros adutos de DNA além, do 1,N²-propanodGuo. Os adutos de acroleína e formaldeído também podem produzir *cross-links* entre fitas de DNA e entre DNA e proteínas. Verificamos níveis muito altos de 1,N²-HO-medGuo, especialmente nos grupos deficientes da proteína SLX4 tratados com 2 mM de acetaldeído. Os adutos de 1,N²-HO-propanodGuo e 1,N²-εdGuo também apresentaram níveis significativamente maiores no grupo SLX4^{-/-} tratado em relação aos grupos *wild type* e SLX4^{-/-} não tratados. Apesar do tratamento com

acetaldeído, os níveis de 1,*N*²-propanodGuo não apresentaram diferenças significativas. Ressaltamos que as vias de reparo responsáveis pela maior parte do reparo de eteno e propano adutos é o reparo por excisão de nucleosídeos (NER) ou por excisão de bases (BER), que estão atuando normalmente nas células onde a proteína SLX4 está ausente, ou seja, os danos causados pelo tratamento com acetaldeído podem estar sendo removidos por esses mecanismos de reparo. Mesmo assim, é possível observar que as células deficientes em SLX4 apresentam níveis basais de adutos maiores que as células *wild type*.

5.1.3. Avaliação de adutos de DNA em modelo de rato de Esclerose Lateral Amiotrófica

Previamente nosso grupo demonstrou que o conteúdo aldeídico em cérebros de ratos que superexpressam o gene SOD1^{G93A}, modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica é significativamente maior que em ratos *wild type*. A formação de 1,*N*²-εdGuo, 1,*N*⁶-εdAdo e 1,*N*²-propanodGuo também foi avaliada utilizando metodologia desenvolvida em nosso laboratório (Garcia et al., 2010, Freitas, 2014). Foi observado um aumento nos níveis de 1,*N*²-propanodGuo nos animais sintomáticos para a doença (4 meses) em relação aos assintomáticos (2 meses). O aduto de 1,*N*²-propanodGuo pode ser gerado por reação do DNA com o crotonaldeído, um aldeído formado na lipoperoxidação, que é iniciada por processos oxidativos promovidos por cobre que pode estar sendo liberado do sitio ativo da enzima SOD1^{G93A} como previamente mostrado pelo nosso grupo (Barbosa et al., 2009).

Diante da possibilidade de ganho de função tóxica da SOD 1 humana modificada gerando o aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente, a produção de aldeídos pela lipoperoxidação, avaliamos se o músculo esquelético de patas dianteiras de ratos superexpressando a SOD1^{G93A} apresentam níveis elevados de adutos de aldeídos como crotonaldeído e acroleína. Os músculos são os primeiros tecidos a sofrer esclerose e paralisia, por isso investigamos esse tecido para comparar os resultados com os de cérebro. Curiosamente, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e ELA sintomáticos nos níveis de 1,N²-εdGuo, 1,N²-HO-propanodGuo, 1,N²-propanodGuo ou 8-oxodGuo, apenas uma notória tendência a aumento. No entanto, o aduto 1,N²-HO-medGuo apresentou diferença significativa entre os grupos. O formaldeído não é formado pela lipoperoxidação, porém está presente em altas concentrações nas células, sendo formado endogenamente pelo metabolismo de aminoácidos e do metabolismo do metanol, gerando o “one carbon pool”, destinado à biossíntese de ácidos nucleicos e outros intermediários (Neuberger, 1981).

5.2. Tratamento dos ratos Wistar com acetaldeído isotopicamente marcado

A detecção do aduto isotopicamente marcado de acetaldeído foi possível após inúmeras tentativas de se desenvolver um método robusto de enriquecimento e purificação para as amostras. Diversas colunas de extração em fase sólida foram testadas, assim como gradientes de eluição, no intuito de remover a maior parte de interferentes da amostra de DNA e evitar supressão de sinal, uma vez que os níveis do aduto exógeno são da ordem de 10⁻¹⁸ mol.

Por isso, após enriquecimento de 1 mg de DNA, seguiu-se com a purificação da amostra por HPLC, por meio de coleta apenas na região de eluição do aduto.

Além disso, foi desenvolvido um método ultrasensível para a detecção, com limite de quantificação de 50 amol e de detecção de 10 amol para o propano aduto, utilizando um sistema de Micro-LC acoplado à um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. Com esse método foi possível identificar os produtos de adição de uma molécula de acetaldeído marcado [$^{13}\text{C}_2$]-1,*N*²-propanodGuo e também os produtos da adição de duas moléculas de acetaldeído marcado, [$^{13}\text{C}_2$]-1,*N*²-propanodGuo. Foram detectadas duas transições para cada um dos adutos, uma de quantificação e outra, de confirmação estrutural.

Apesar da alta sensibilidade dos analisadores do tipo triplo quadrupolo, este não é um sistema de alta resolução de massas. Por isso, para detectar a massa exata dos adutos e de seus produtos de fragmentação, foi desenvolvido um método de nanoLC-nanoESI⁺-HRMS³ com limite de detecção de 50 amol, utilizando um equipamento Orbitrap Fusion Lumos, da Thermo Scientific, que possui um quadrupolo, um analisador do tipo Ion Trap e um Orbitrap. Dessa forma, conseguimos selecionar os íons desejados no quadrupolo, realizar as fragmentações em celas de colisão e analisar os fragmentos no Orbitrap.

Em conclusão, a detecção do 1, *N*²-propanodGuo marcado no cérebro e no pulmão de ratos expostos por inalação a acetaldeído mostra inequivocamente que o acetaldeído nas concentrações encontradas na atmosfera de megacidades se liga ao DNA formando um aduto mutagênico que pode estar envolvido em risco de câncer associado a este aldeído tóxico.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, desenvolvemos metodologia ultrasensível para detecção de cinco adutos de DNA: 1,*N*²-HO-medGuo, 1,*N*²-HO-propanodGuo, 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo, além da lesão oxidativa 8-oxodGuo, por técnica de HPLC acoplada à espectrometria de massas, utilizando o método de monitoramento de reação selecionada (SRM). Padrões não marcados e isotopicamente marcados foram sintetizados e purificados permitindo a quantificação desses adutos em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Amostras de DNA foram expostas à fumaça de cigarro de tabaco e de cannabis e analisadas pelo método desenvolvido. As amostras controle apresentaram níveis de adutos de 8-oxodGuo e as amostras tratadas apresentaram a formação de todos os adutos monitorados. O cigarro de cannabis apresentou menores níveis dos adutos 1,*N*²-HO-medGuo, 8-oxodGuo, 1,*N*²-HO-propanodGuo e 1,*N*²- ϵ dGuo em relação ao grupo tratado com a fumaça de cigarro mas níveis maiores de 1,*N*²-propanodGuo.

Células de fibroblastos de camundongo ausentes da proteína SLX4 em modelo de Anemia Fanconi também foram analisadas pela metodologia. As células foram tratadas com 2 mM de acetaldeído. Células *wild type* também foram utilizadas para comparação. Os níveis basais de adutos nas células controle SLX4^{-/-} se mostrou maior em relação ao grupo controle *wild type*. Além disso, as células SLX4^{-/-} tratadas com acetaldeído apresentaram níveis significativamente diferentes frente ao controle SLX4^{-/-} e aos grupos controle e

tratados das células *wide type* para os adutos 1,*N*²-HO-medGuo, 8-oxodGuo e 1,*N*²-HO-propanodGuo.

Também foram analisados tecidos de músculo esquelético de ratos superexpressando a SOD1^{G93A} humana, modelo para a Esclerose Lateral Amiotrófica. O aduto 1,*N*²-HO-medGuo apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo ELA. Não foram observadas diferenças significativas para os demais adutos entre o grupo controle e o grupo ELA sintomático, apenas uma tendência de aumento nos níveis dos adutos. A análise de urina humana pode ser um potencial futuro para a aplicação da metodologia, utilizando estes adutos como biomarcadores de exposição ou como indicadores de aumento endógeno de aldeídos.

Mostramos, inequivocamente, pela primeira vez, a formação do aduto de 1,*N*²-propanodGuo por inalação, em tecido de cérebro e pulmão de ratos tratados com acetaldeído isotopicamente marcado, utilizando novas metodologias de microLC-ESI⁺-MS/MS e de nanoLC-nanoESI⁺-HRMS³ para realizar a confirmação estrutural dos adutos exógenos. Esses resultados mostram que o acetaldeído, exposto por inalação em concentrações similares às encontradas na atmosfera de grandes cidades reage com o DNA formando adutos mutagênicos que podem estar envolvidos em mecanismos de câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUERBACH, A. D. Fanconi-anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Exper. Hemat.** v. 21, n. 6, p. 731-733, 1993.

AYALA, A., et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Volume 2014, Article ID 360438

AYI-FANOU, L. et al. DNA-Adducts in Subjects Exposed to Urban Air Pollution by Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin. **Environm. Toxicol.**, v. 26, n. 1, p. 93-102, 2011.

BISPO V.S. et al, Structural Elucidation of a Carnosine-Acrolein Adduct and its Quantification in Human Urine Samples. **Sci Rep.** 2016 Jan 19; 6:19348

BLAIR, I. A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. **Biomed. Chromatography**, v. 24, n. 1, p. 29-38, 2010

BLAIR, I. A. Endogenous glutathione adducts. **Curr. Drug. Metab.**, v. 7, n. 8, p. 853-72, 2006

BLAIR, I. A. DNA adducts with lipid peroxidation products. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 23, p. 15545-15549, 2008

BARBER, S. C.; SHAW, P. J. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, n. 5, p. 629-41, 2010

BARBOSA, L. F. et al. Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. **Biochim. Et Biophys. Acta-Mol. Basis of Disease**, v. 1802, n. 5, p. 462-471, 2010.

BENDOTTI C., et al. Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** (2004). 63, 113–119.

BOILLEE, S. et al. ALS: A disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 39-59, 2006

BOILLEE, S. et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. **Science**, 2006. Jun 2;312(5778):1389-92.

CADET, J. et al. Measurement of oxidatively generated base damage to nucleic acids in cells: Facts and artifacts. **Bioanalytical Reviews**, v. 4, n. 2-4, p. 55-74, 2012

CADET, J.,. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mut. Res. –Genetic. Toxicol. Environm. Mutagenesis*, v. 711, n. 1-2, p. 3-12, 2011

CARROCHO, M. et al. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15. 2013.

CASANOVA-SCHIMITZ M., HECK H. D. Effects of formaldehyde exposure on the extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983 Aug;70(1):121-32.

CETESB Qualidade do ar no estado de São Paulo 2017. São Paulo. 2017. (Série Relatórios / CETESB).

CHENG, K. C. et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative dna damage, causes G -> T and A -> C substitutions. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 1, p. 166-172, 1992

CHIO, A. et al. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J. Neurol. Neurosur. Psyc.*, v. 82, n. 7, p. 740-746, 2011

CHO, Y.-J. et al. Orientation of the crotonaldehyde-derived N-2- 3-oxo-1(S)-methyl-propyl -dGDNA adduct hinders interstrand cross-link formation in the 5' - CpG-3' sequence. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 19, n. 8, p. 1019-1029, 2006

CHUNG, F.L. et al. Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* 1984 Mar;44(3):990-5.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education*, (2008) 1(1):103

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 11, p. 756-768, 2009

COLLINS, A. R. et al. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arc. Biochem. Biophys.*, v. 423, n. 1, p. 57-65, 2004

COZZOLINO, M. et al. Mitochondria and ALS: implications from novel genes and pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2012, 55, 44-49

COZZOLINO, M.; FERRI, A.; CARRI, M. T. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 10, n. 3, p. 405-43, 2008

CARRÌ, M.T. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. **Brain research bulletin**, 2003, 61 (4), 365-374

CROSBY, R.M. Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and E. coli. **Environ Mol Mutagen**. 1988;12(2):155-66.

DAVID, S.S, et al. Base-excision repair of oxidative **DNA** damage. **Annu Rev Biochem**. 2010;79:181-211.

DETRAN. Portal Detran. Frota de veículos na RMSP em 2016. Disponível em: <https://www.detran.sp.gov.br/wps/wcm/connect/portaldetran/detran/detran/estatisticastransito/sa-frotaveiculos/d28760f7-8f21-429f-b039-0547c8c46ed1>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

Di MASCIO, P. Molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. **Ciência e Cultura**, (1985). 47, 297.

EDER, E.; BUDIAPAN. Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD50 and comparison with 1,N-2-propanodeoxyguanosine adduct levels. **Cancer Epidem. Biomar. Prev.**, v. 10, n. 8, p. 883-888, 2001

EPA, O., OAQPS. Particulate Matter (PM). 2014. Disponível em: < <https://www.epa.gov/pm-pollution> >. Acesso em: 15 de janeiro de 2017

FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. **Acs Chem. Biol.**, v. 4, n. 3, p. 161-177, 2009

FREITAS, F. P. Investigação de potenciais biomarcadores redox – um enfoque em aldeídos. **Tese de doutorado**, 2014.

FRITZ, K. S.; PETERSEN, D. R. Exploring the Biology of Lipid Peroxidation-Derived Protein Carbonylation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 24, n. 9, p. 1411-1419, 2011

FRITZ, K. S. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 59, p. 85-91, 2013

FUJIOKA., K.; SHIBAMOTO, T.; Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. **Environmental Toxicology**. (Fev 2006).

GARCIA, C. C. M. et al. (13)C(2) - Acetaldehyde Promotes Unequivocal Formation of 1,N(2)-Propano-2 '-deoxyguanosine in Human Cells. **JACS**, v. 133, n. 24, p. 9140-9143, 2011

GARCIA. Ultrasensitive Simultaneous Quantification of 1,N-2-Etheno-2 '-deoxyguanosine and 1,N(2-)Propano-2 '-deoxyguanosine in DNA by an Online Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 23, n. 7, p. 1245-1255, 2010.

GARCIA. Elevated alpha-Methyl-gamma-hydroxy-1,N-2-propano-2'-deoxyguanosine Levels in Urinary Samples from Individuals Exposed to Urban Air Pollution. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 26, n. 11, p. 1602-1604, 2013.

GATES, K. S. An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 11, p. 1747-1760, 2009

GOODALL E.F., MORRISON K.E. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment. **Expert Rev Mol Med.** 2006 May 24;8(11):1-22.

GUERAUD, F. et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Rad. Res.**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Rad. Biol. Med.** 4. New York: Oxford University Press 2007. 851.

HECHT, S. S. Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 6, p. 907-22, 2002

HECHT, S. S.; MCINTEE, E. J.; WANG, M. Y. New DNA adducts of crotonaldehyde and acetaldehyde. **Toxicology**, v. 166, n. 1-2, p. 31-36, 2001

ESTERBAUER, H., DIETER G. Seasonal Variation of Glutathione and Glutathione Reductase in Needles of *Picea abies* **Plant Physiol.** (1978) 61, 119-121

HARMAN, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981) USA, 78: 7124–7128.

HEMERYCK, L. Y et al. Mass Spectrometric Mapping of the DNA Adductome as a Means to Study Genotoxin Exposure, Metabolism, and Effect **Anal. Chem.**, 2016, 88 (15), pp 7436–7446

HERRLING, T.. Measurements of UV-generated free radicals/ reactive oxygen species (ROS) in skin. **Spectrochimica Acta Part A**, 63, 840. 2006.

HODGSON, E. K.; FRIDOVICH, I. Interaction Of Bovine Erythrocyte Superoxide-Dismutase With Hydrogen-Peroxide - Chemiluminescence And Peroxidation. **Biochemistry**, v. 14, n. 24, p. 5299-5303, 1975

HODGSON E. K. and FRIDOVICH I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. **Biochemistry** (1975) 14, 5299±5303.

HOWLAND, D. S. et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **PNAS**, v. 99, n. 3, p. 1604-1609, 2002.

IARC. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. 63: 373 - 391 p. 1995.

IARC. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide (Part one, Part two, Part three): the World Health Organization. 71 part1, part 2 and part 3: 319 - 335 p. 1999.

JONES D. P.; Sies H. The redox code. **Antioxid Redox Signal** (2015) 23: 734–746

JONES D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact* 163(1-2): 38-53, 2006.

KANALY R. A. et al. Development of the Adductome Approach to Detect DNA Damage in Humans, **Antioxidants & Redox Signaling**, May 2006, Vol. 8, No. 5-6: 993-1001

KIM, H.; D'ANDREA, A. D. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. **Genes & Development**, v. 26, n. 13, p. 1393-1408, 2012

KIERNAN, M. C. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 377, n. 9769, p. 942-955, 2011

KNEEPKENS, C. M. F.; LEPAGE, G.; ROY, C. C. THE POTENTIAL OF THE HYDROCARBON BREATH TEST AS A MEASURE OF LIPID-PEROXIDATION. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 17, n. 2, p. 127-160, 1994

KORKY, J. K.; SCHUWATZ, S.R. & LUSTIGMAN, B.K. Formaldehyde concentrations in biology department teaching facilities. (1987) **Bull. environ. Contam. Toxicol.**, 38, 907–910

KRUEGER, T. et al. Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery. **Proteom. Clin. Appl.**, v. 7, n. 1-2, p. 123-135, 2013

LAMAS, S et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biol.** (2015) 183-97.

LANGEVIN, F. et al. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. **Nature**, v. 475, n. 7354, p.53-58, 2011

LEANDERSON, P., and TAGESSON, C. Cigarette smoke potentiates the DNA-damaging effect of manmade mineral fibers. **Am. J. Indus. Med.** 16, 697-706. (1989)

LEPAGE, F. et al. MUTAGENICITY OF A UNIQUE 8-OXOGUANINE IN A HUMAN HA-RAS SEQUENCE IN MAMMALIAN-CELLS. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 11, p. 2779-2784, 1995

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand **DNA** break repair by the nonhomologous **DNA** end-joining pathway. **Annu Rev Biochem.** 2010;79:181-211

LIN, T. S. et al. 8-substituted guanosine and 2'-deoxyguanosine derivatives as potential inducers of differentiation of Friend erythroleukemia cells. **J. Med. Chern.** 28: 1194-1197. (1985)

LOBITZ, S.; VELLEUER, E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 11, p. 893-898, 2006

LODISH, H. Molecular Cell Biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

LOOMIS, D. et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **The Lancet Oncology**, V.14, n. 13, p. 1262-1263, 2013

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v.481, p. 287-294, 2012

LOUREIRO, A. P. M. et al. Trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 7, p. 601-9, 2000

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 66, n. 8, p. 75-87, 2013.

LU, K. Distribution of DNA Adducts Caused by Inhaled Formaldehyde Is Consistent with Induction of Nasal Carcinoma but Not Leukemia **Toxicol Sci.** 2010 August; 116(2): 441–451.

MAÎTRE A., Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. **Scand. J. Work Environ. Health**, 28, 402–410 (2002)

MANICKA V., et al. Oxidative DNA Adducts Detected in Vitro from Redox Activity of Cigarette Smoke Constituents. **Chemical Research in Toxicology.** (2012)

MARNETT, L. J. et al. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in salmonella tester strain TA104. **Mutat. Res.** 148, 25–34. (1985)

MATSUDA, T., et al. Effective utilization of N2-ethyl-2'-deoxyguanosine triphosphate during DNA synthesis catalyzed by mammalian replicative DNA polymerases. (1999)

MCCORD, J. M.; FRIDOVIC.I. superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6049-&, 1969

McGHEE J. D, von Hippel P. H. Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. **Biochemistry** (Mosc). 1975;14:1281–1296.

MEDEIROS, M. H. G. 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.**, v. 22, n. 3, p. 419-425, 2009

MINKO, I. G. et al. Chemistry and Biology of DNA Containing 1,N-2-Deoxyguanosine Adducts of the alpha,beta-Unsaturated Aldehydes Acrolein, Crotonaldehyde, and 4-Hydroxynonenal. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 5, p. 759-778, 2009

MITCHELL, J. D.; BORASIO, G. D. Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 369, n. 9578, p. 2031-2041, 2007

MOGHE, A. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. **Toxicol Sci.** 2015 Feb;143(2):242-55.

MOYNAHAN M. E., JASIN M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2010 196-207.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism.**, v. 13, n. 4, p. 361-366, 2011

NEUBERGER A. The metabolism of glycine and serine. **Elsevier**; Amsterdam: 1981.

NICHOLLS, R. et. al. Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. **Int J Biochem.** 1992 Dec;24(12):1899-906.

NIEMELÄ, O. Acetaldehyde adducts of proteins: Diagnostic and pathogenic implications in diseases caused by excessive alcohol consumption. **Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory Investigation** Vol. 53 , Iss. Sup213,1993

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. **PNAS**, v. 99, n. 13, p. 9010-4, 2002

PAOLLETI, P. (1995). Application of Biomarkers in Population Studies for Respiratory Nonmalignant Diseases. **Toxicology**, 101, 99-105.

PATEL, K.J. JOENJE, H. Fanconi anemia and DNA replication repair. **DNA Repair** (Amst). 2007 Jul 1;6(7):885-90. Epub 2007 May 3.

PELUSO, M. et al. Malondialdehyde-deoxyguanosine and bulky DNA adducts in schoolchildren resident in the proximity of the Sarroch industrial estate on Sardinia Island, Italy. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 315-321, 2013

PELUSO, M. et al.. DNA adducts and lung cancer risk: A prospective study. **Canc. Res.**, v. 65, n. 17, p. 8042-8048, 2005.

PUTMAN, C. D. et al. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **J Mol Biol.** 2000 Feb 11;296(1):295-309.

RADICELLA, J. P. et al. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **PNAS**, v. 94, n. 15, p. 8010-8015, 1997

RAPPAPPORT, S. M. et al. Adductomics: Characterizing exposures to reactive electrophiles **Toxicol Lett.** 2012 Aug 13; 213(1): 83–90.

RAVANAT, J. L. et al. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 11, p. 1911-1918, 2002

RAVANAT, J. L. et al. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. **Biol Chem** 385: 17–20 [PubMed]

SAKO, M. et al. Chemo- and regio-selective modifications of nucleic acids by acetaldehyde and crotonaldehyde. **Nucleic Acids Res**, Suppl 2: 21–22 (2002)

SAKO, M, et al. Histones accelerate the cyclic 1,N2-propanoguanine adduct-formation of DNA by the primary metabolite of alcohol and carcinogenic crotonaldehyde. **Bioorg Med Chem Lett** 13: 3497–3498 (2003)

SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction Of No With O₂- Implications For The Action Of Endothelium-Derived Relaxing Factor (Edrf). **Free Rad. Res. Comm.**, v. 10, n. 4-5, p. 221-226, 1990

SATO, H, et al. DNA-adduct formation in lungs, nasal mucosa, and livers of rats exposed to urban roadside air in Kawasaki City, Japan. **Environmental Research**, 93, 36-44. (2003).

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 41, n. 1, p. 12-25, 2006

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion Of Specific Bases During Dna-Synthesis Past The Oxidation-Damaged Base 8-Oxodg. **Nature**, v. 349, n. 6308, p. 431-434, 1991

SIES, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. **Mutation Research**, 299, 183-191(1993).

SILANI, V. C. L.; CORBO M, et al. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet** 2004;364(9429):200-2.

SINGER, B. e BARTSCH, H. (Ed.). Benzoquinone exocyclic adducts derived from the carcinogens vinyl chloride and benzene. In: **Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis**, 1999. p.233-247. (Iarc Scientific Publications).

SINGH, R. et al. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mut. Res.* –**Fund. Mol. Mech. Mut.**, v. 620, n. 1-2, p. 83-92, 2007

SINGH, R. et al. Evaluation of the DNA Damaging Potential of Cannabis Cigarette Smoke by the Determination of Acetaldehyde Derived N2-Ethyl-2'-deoxyguanosine Adducts **Chem. Res. Toxicol.** 2009, 22, 1181–1188

SPINOSA DE MARTINIS, B. et al. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from Sao Paulo, Brazil. **Mut. Res. – Gen. Toxicol. Environm. Mut.**, v. 446, n. 1, p. 83-94, 1999

STOEPKER, C. et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, 2011

STEVENS, J. F; MAIER, C.S. Acrolein: Sources, Metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease, **Mol. Nutr. Food Res** 2008 52, 7-25

SUH, H.H. et al. Criteria air pollutants and toxic air pollutants. **Environ. Health Perspect.**, 108 (Suppl. 4), 625–63(2000)

SUGIMURA H. Susceptibility to human cancer: From the perspective of a pathologist. **Pathol Int.** 2016 Jul;66(7):359-68.

TAINER JA, Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. **J Mol Biol.** (1982),160(2):181-217.

TOLEDO, J. C., JR.; AUGUSTO, O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 25, n. 5, p. 975-989, 2012

TRETYKAYOVA, N. et al. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. **Chem Res Toxicol.** Author manuscript; available in PMC 2013 Oct 15

WANG, M. et al. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 11, p. 1149-1157, 2000

WANG M, et al. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N2-ethyldeoxyguanosine. **Chem Res Toxicol.** 2006 Feb; 19(2):319-24.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chem. Biol.**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008

WORRAL, S. et al. Mammalian enzymatic repair of ethanol and para-Acetaldehyde-modified proteins and associated antibodies in ethanol-fed rats Alcohol; **Alcohol Suppl.** 1991;1:255-60.

YANAGI, Y.; DE ASSUNCAO, J. V.; BARROZO, L. V. The impact of atmospheric particulate matter on cancer incidence and mortality in the city of Sao Paulo, Brazil. **Cadernos De Saude Publica**, v. 28, n. 9, p. 1737-1748, 2012

YANG, H. J. et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1837-1848, 2002

YANG, I.-Y. et al. Mutagenesis by Acrolein-Derived Propanodeoxyguanosine Adducts in Human Cells. **Biochemistry**, v. 41, n. 46, p. 13826-13832, 2002

XIE, Z. et al. Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: From chemistry to clinical implications. **Chemico-Biol. Interac.**, v. 202, n. 1-3, p. 288-297, 2013

ZHANG S. Detection and quantitation of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Chem Res Toxicol.** (2007) 20(4):565-71.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química da USP.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD1^{G93A}", desenvolvido sob a responsabilidade da Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 25/02/2008.

We attest that the project entitled "Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD1^{G93A}", developed under the responsibility of Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 2/25/2008.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2008

Maria Júlia Manso Alves
Coordenador CECUA

ANEXO II – Certificado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Instituto de Química da USP.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Protocolo CIBio/IQ-USP No. 03/2013

Certifico que o Projeto "*Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma*", desenvolvido sob responsabilidade da Profa. Dra. **Marisa Helena Gennari de Medeiros**, para trabalhar com Organismos Geneticamente Modificado – OGM, está de acordo com as normas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio e foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança – CIBio do Instituto de Química-USP em 06/05/2013.

São Paulo, 06 de maio de 2013

Prof. Dr. Ricardo José Giordano
Presidente da CIBio
IQ-USP

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Angélica Bianchini Sanchez

Campinas, São Paulo – 09 de novembro de 1982

2. EDUCAÇÃO

E.E. Profª Maria Julieta de Godoi Cartezani – Campinas, SP – 2000.

E.T.E.C Conselheiro Antônio Prado – ETECAP – 2003

Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

Bacharelado em Química Ambiental - 2010

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2014 - 2014 Curso de curta duração em Treinamento em microLC. (Carga horária: 48h).
Sciex do Brasil, SCIEEX, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Sunrise Free Radical School. (Carga horária: 5h).
Society for Free Radicals in Biology and Medicine., SFRBM,
Estados Unidos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Treinamento Operacional em Espectrometria de Massa. (Carga horária: 48h).
Sciex do Brasil, SCIEX, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2011 - 2011** I ESPCA on Redox Processes in Biomedicine. . (Carga horária: 72h).
INCT de Processos Redox em Biomedicina., REDOXOMA, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Training on the use of laboratory animals. (Carga horária: 3h). Instituto de Ciências Biomédicas - USP, ICB, Brasil

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, CNPq, 2011 - 2016

5. PUBLICAÇÕES

5.1. Artigos publicados em periódicos

SANCHEZ, ANGÉLICA BIANCHINI; DI MASCIIO, PAOLO; DE MEDEIROS, MARISA HELENA GENNARI. Quantification of 1,N²-Propano-2'-deoxyguanosine in Rat Pulmonary DNA by Micro Chromatography - Electro spray Tandem Mass Spectrometry Assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 76, p. S146, 2014.

CHAUSSE, BRUNO; VIEIRA-LARA, MARCEL A.; SANCHEZ, ANGÉLICA B.; MEDEIROS, MARISA H. G.; KOWALTOWSKI, ALICIA J. Intermittent Fasting

Results in Tissue-Specific Changes in Bioenergetics and Redox State. **Plos One**, v. 10, p. e0120413, 2015.

GARCIA, CAMILA C.M.; BATISTA, GUILHERME L.; FREITAS, FLORÊNCIO P.; LOPES, FERNANDO S.; SANCHEZ, ANGÉLICA B.; GUTZ, IVANO G.R.; DI MASCIO, PAOLO; MEDEIROS, MARISA H.G.. Quantification of DNA adducts in lungs, liver and brain of rats exposed to acetaldehyde. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 75, p. S41, 2014.

GARCIA, CAMILA C. M.; FREITAS, FLORÊNCIO P.; SANCHEZ, ANGÉLICA B.; DI MASCIO, PAOLO MEDEIROS, MARISA H. G. Elevated α -Methyl- γ -hydroxy-1, N²-propano-2--deoxyguanosine Levels in Urinary Samples from Individuals Exposed to Urban Air Pollution. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 131106135815001, 2013.

5.2. Resumos publicados em anais de congressos

SANCHEZ, ANGÉLICA BIANCHINI; DI MASCIO, PAOLO; DE MEDEIROS, MARISA HELENA GENNARI. Quantification of 1,N²-Propano-2'-deoxyguanosine in Rat Pulmonary DNA by Micro Chromatography - Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay. Conference of the Society for Free Radicals in Biology and Medicine. Novembro de 2014. Seattle, Washington, U.S.

SANCHEZ, A. B.; GARCIA, C. C. M.; FREITAS, F. P.; Di Mascio, P.; MEDEIROS, M. H. G. DNA adducts mapping and investigation of possible urban pollution biomarkers, 2011. VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro - SP.

GARCIA, C. C. M.; FREITAS, F. P.; BATISTA, G.; SANCHEZ, A. B.; Angeli, José P. F.; GOMES, O. F.; Di Mascio, P.; GUTS IGR; MEDEIROS, M. H. G. Low doses of inhaled acetaldehyde promote lipid peroxidation and DNA damage in rats, 2011. VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro - SP.

GARCIA, C. C. M.; FREITAS, F. P.; Angeli, José P. F.; GOMES, O. F.; SANCHEZ, A. B.; Di Mascio, P.; MEDEIROS, M. H. G. Acetaldehyde promotes DNA adducts formation, DNA fragmentation and lipid peroxidation in rats, 2009. XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Aguas de Lindóia - SP. Livro de Resumo, 2009.

SANCHEZ, A. B.; GARCIA, C. C. M.; FREITAS, F. P.; Angeli, José P. F.; Di Mascio, P.; MEDEIROS, M. H. G. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Analysis of Oxidative Damages in SOD1G93A Transgenic Rat Livers, 2009. XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Aguas de Lindóia - SP. Livro de Resumo, 2009.

6. Prêmios e títulos

Travel & Young Investigator Awards, pelo resumo “Quantification of 1,*N*²-Propano-2'-deoxyguanosine in Rat Pulmonary DNA by Micro Chromatography - Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay” apresentado durante a Conferência da Sociedade de Radicais Livres em Biologia e Medicina, em novembro de 2014, em Seattle, Washington, U.S.